



Etude de l'extraction des protéines de coproduits d'abattage et de leur valorisation comme ingrédients fonctionnels

Darine Selmane

► To cite this version:

Darine Selmane. Etude de l'extraction des protéines de coproduits d'abattage et de leur valorisation comme ingrédients fonctionnels. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010. Français. <NNT : 2010CLF22038>. <tel-00719205>

HAL Id: tel-00719205

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00719205>

Submitted on 19 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° D.U. :2038

Année 2010

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

CLERMONT UNIVERSITES

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre : 520**

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Génie des Procédés Alimentaires)

Darine SELMANE

**Étude de l'Extraction des Protéines de Coproduits d'Abattage et de
leur Valorisation comme Ingrédients Fonctionnels**

Soutenue publiquement le 28 Juin 2010 devant le jury composé de :

Président :

DUSSAP Claude Gilles

Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Fd

Rapporteurs :

LEGRAND Jack

Professeur, GEPEA-CRTT, Saint-Nazaire

SAUREL Rémi

Professeur, AgroSup Université de Dijon,

Examineurs :

COURTHAUDON Jean Luc

Professeur, Université d'Angers, Angers

DJELVEH Gholamreza

Professeur, ENSCCF, Clermont-Fd

VIAL Christophe

MCF, ENSCCF, Clermont-Fd

Invités :

CULIOLI Joseph

Directeur de Recherche, INRA, Theix, Clermont-Fd

LEMOIN Eric

Ingénieur, ADIV, Clermont-Fd

Directeur de thèse : Gholamréza DJELVEH

Laboratoire : Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique

Université Blaise Pascal, 24 av des Landais, B.P. 206, F-63174, Aubière Cedex, France

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique de l'université Blaise Pascal à Clermont-Ferrand. Je remercie tout d'abord Monsieur Claude-Gilles DUSSAP, Directeur du LGCB, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mon directeur de thèse Gholamreza DJELVEH, professeur à L'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, ainsi qu'à Christophe VIAL, maître de conférences dans ce même établissement. Je voudrais les remercier tous deux pour leur sympathie, leur disponibilité et surtout leurs conseils lors de toutes les étapes de mon doctorat.

Je tiens également de remercier messieurs Jack LEGRAND directeur de laboratoire GEPEA-CRTT et professeur à l'Université de Nantes, Rémi SAUREL professeur à AgroSup à l'Université de DIJON et Jean Luc COURTHAUDON professeur à l'Université d'Angers d'avoir bien accepté la charge de rapporteur ou examinateur de mon jury de thèse.

Je souhaiterais de remercier tous les personnes de l'ADIV pour leurs aides pour valoriser mon travail, parmi eux Eric Lemoin et Audile Burton.

Je tiens de remercier également Philippe MICHON, Jean-François Cornet, Fabrice GROS pour leurs aide et ses gentillesse.

Ensuite, je voudrais remercier tout particulièrement, Frédéric BRUN, technicien à l'ENSCCF et David DUCHEZ, assistant ingénieur au LGCB pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans les aspects pratiques de mon travail et pour leurs conseils et leur gentillesse à mon égard.

Je souhaiterais enfin saluer tous les autres membres du LGCB que j'ai croisés pendant ma présence, à la fois pour leur sympathie et leur bonne humeur.

J'adresse mon grand merci à mon mari qui m'a soutenu et encouragé tout au long de mon travail. J'adresse mes remerciements à toute ma famille et ma meilleure amie en Syrie.

En fin, je tiens de remercier l'Université de AL-BAATH en Syrie pour son soutien financier.

Résumé

L'objectif de ce travail est de montrer que certains coproduits d'abattage (VSM de poulet et de poumon de bœuf) peuvent constituer une source de protéines qui peut être valorisée sous forme d'ingrédients fonctionnels. Nos résultats ont montré la possibilité d'extraction de ces protéines par solubilisation en milieu alcalin, puis concentration soit par une technique membranaire (microfiltration), soit par précipitation en milieu acide. Il a été démontré que le meilleur rendement de récupération de protéines et la pureté la plus élevée ne correspondent pas nécessairement aux meilleures fonctionnalités. Les protéines de la VSM de poulet présentent un bon potentiel pour être utilisées dans les préparations à base de viande, notamment pour leurs fortes propriétés gélifiantes. Les protéines concentrées de poumon de bœuf (PCPB) ont montré une grande affinité avec les lipides qui traduisent leurs fortes hydrophobicité de surface et activité émulsifiante. Les PCPB ont également présenté une très bonne capacité émulsifiante en présence de xanthane lors de l'émulsification en continu par un système de rotor/stator. Il est donc possible de les utiliser comme agent émulsifiant en place des caséinates considérés comme l'agent émulsifiant référence. L'aptitude au foisonnement des PCBP dans des formulations complexes en batch et en continu n'est pas affectée par la présence des polysaccharides, mais elle est très sensible à la présence des lipides.

Mot-clefs : Coproduits d'abattage ; protéines ; extraction ; valorisation ; propriétés fonctionnelles.

Abstract

The aim of this work is to show that slaughterhouse by-products (MDM of chicken and beef lung) can be a good source of proteins that can be valorised as functional ingredients. Our results showed that it is possible to extract proteins from these by-products by alkaline solubilisation, followed by concentration of proteins using membrane process (microfiltration) or using acid precipitation. It was showed that the best extraction yield and the best purity of proteins extraction were not necessarily related to the best functional properties. Proteins extracted from MDM exhibited very good gelation properties and can replace commercial ingredients, such as plasma proteins in meat products. Beef lung concentrated proteins (BLCP) displayed a good emulsifying activity and a good surface hydrophobicity which is mainly due to their high affinity with lipids. The emulsifying properties of BLPC in the presence of xanthan gum were investigated under steady state conditions using a continuous rotor/stator device. The high emulsifying properties of BLPC were confirmed in the presence of xanthan. BLPC can therefore be used as emulsifiers in elaborated meat products in place of the commonly used caseinates. Finally, the foaming ability of BLCP in complex medium was investigated in batch and in continuous processes. The presence of polysaccharides in the formulations did not affect the overrun of the foams, whereas, the presence of lipids decreased remarkably the overrun.

Keywords: slaughterhouse by-products; proteins; extraction; valorisation; functional properties.

Table des matière

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I.1 Les coproduits dans l'agroalimentaire.....	5
I.1.1 Généralités	5
I.1.2 Exemples de coproduits alimentaires déjà valorisés	7
I.1.2.1 Cas du lactosérum.....	7
I.1.2.2 Cas du sang.....	8
I.1.3 Coproduits issus de l'industrie de la viande	8
I.1.3.1 Viande séparée mécaniquement (VSM)	10
I.1.3.2 Poumon de bœuf.....	10
I.2 Extraction et purification des protéines	11
I.2.1 Facteurs affectent l'extraction des protéines	11
I.2.2 Principales étapes nécessaires à l'extraction des protéines	12
I.2.3 Concentration/purification des protéines.....	13
I.2.3.1 concentration/Purification par procédés membranaires	13
I.2.3.2 concentration/Purification des protéines par précipitation	15
I.3 Propriétés fonctionnelles des protéines	17
I.3.1 Pouvoir de rétention d'eau (PRE).....	18
I.3.1.1 Définition.....	18
I.3.1.2 Méthodes de caractérisation	18
I.3.1.3 Facteurs influençant le pouvoir de rétention d'eau	20
I.3.2 Propriétés gélifiantes des protéines	21
I.3.2.1 Définition.....	21
I.3.2.2 Méthodes de détermination des propriétés gélifiantes des protéines	21
I.3.2.3 Facteurs influençant la formation du gel	22
I.3.3. Propriétés émulsifiantes.....	22
I.3.3.1 Aspects généraux de la formation et de la stabilisation des émulsions	22
I.3.3.2 Méthodes de détermination des propriétés émulsifiantes des protéines.....	25
I.3.3.3 Facteurs influençant l'émulsification	28
I.3.4 Propriétés moussantes.....	30
I.3.4.1 Aspects généraux de la formation et de la stabilisation des mousses alimentaires	30
I.3.4.2 Méthodes de détermination des propriétés moussantes des protéines.....	30
I.3.4.3 Facteurs influençant la formation et la stabilité d'une mousse	32
I.4 Ingrédients protéiques commerciaux	33
I.4.1 Caséines	33
I.4.2 Protéines de lactosérum	34
I.4.3 Protéines de soja	35
I.4.4 Protéines du blanc d'œuf	35
I.4.5 Protéines de plasma sanguin.....	36

I.5 Interactions entre les protéines et les autres hydrocolloïdes.....	36
I.5.1 Généralités sur les hydrocolloïdes.....	36
I.5.2 Description des principaux types d'interactions entre protéines et polysaccharides...	37
I.5.3 Le xanthane.....	38
I.6 Émulsification et foisonnement : procédés et équipements.....	41
I.6.1 Aspects technologiques de l'émulsification et du foisonnement.....	42
I.6.1.1 Procédés discontinus.....	44
I.6.1.2 Procédés continus.....	47
I.7 Conclusions de la synthèse bibliographique.....	52

CHAPITRE II. MATERIELS & METHODES.....53

II.1 Matières premières	54
II.2 Protocole d'extraction des protéines.....	54
II.3 Protocoles de concentration/purification des protéines	56
II.3.1 Protocoles de concentration/purification par filtration tangentielle	56
II.3.2 Protocole de concentration/purification par précipitation isoélectrique	58
II.4 Propriétés fonctionnelles des protéines.....	59
II.4.1 Propriétés gélifiantes	59
II.4.2 Propriétés moussantes	60
II.4.3 Propriétés émulsifiantes	60
II.4.3.1 Capacité émulsifiante	60
II.4.3.2 Activité émulsifiante	61
II.4.4 Pouvoir de rétention d'eau (PRE)	62
II.5 Propriétés physico-chimiques des protéines extraites	62
II.5.1 Mesure de la solubilité	62
II.5.2 Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE.....	62
II.5.3 Chromatographie d'exclusion stérique (GPC)	63
II.5.4 Mesure de l'hydrophobicité de surface	64
II.5.5 Mesure des tensions de surface et interfaciale	64
II.6 Application des protéines extraites à l'émulsification en continu	65
II.6.1 Préparation et caractérisation de la phase aqueuse.....	65
II.6.2 Émulsion : préparation en continu et caractérisation	67
II.6.3 Méthodologie d'étude du couplage formulation/procédé	69
II.7 Application des protéines extraites à l'opération de foisonnement en continu.....	72
II.7.1 Formation de mousse en discontinu	72
II.7.2 Foisonnement en continu (colonne de foisonnement).....	73

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION ; 1 ERE PARTIE

ÉTUDE DE LA VALORISATION DE LA VSM.....76

III.1 Extraction des protéines de la VSM	77
III.1.1 Étape de solubilisation des protéines	77
III.1.1.1 Effet du pH.....	78
III.1.1.2 Effets de la durée d'extraction et de la température	81
III.1.2 Étape de concentration des protéines	81
III.1.2.1 Concentration par technique membranaire	82
III.1.2.2 Concentration par précipitation au point isoélectrique	84
III.2 Propriétés fonctionnelles des protéines extraites de la VSM.....	86
III.2.1 Propriétés gélifiantes.....	86
III.2.2 Propriétés moussantes.....	88
III.2.3 Propriétés émulsifiantes	90
III.3 Conclusions	91

CHAPITRE IV. RESULTATS ET DISCUSSION ; 2 EME PARTIE

ÉTUDE DE LA VALORISATION DE POUMON DE BŒUF93

IV.1 Extraction des protéines de poumon de bœuf.....	94
IV.1.1 Étape de solubilisation des protéines	94
IV.1.1.1 Effet du rapport massique (poumon de bœuf/eau)	94
IV.1.1.2 Effet du pH.....	95
IV.1.1.3 Effet de la température et de la durée d'extraction	96
IV.1.2 Étape purification/concentration des protéines	97
IV.1.2.1 Purification/concentration par procédé membranaire	97
IV.1.2.2 Purification/concentration par précipitation au point isoélectrique	98
IV.2 Caractérisation du PCPB.....	101
IV.2.1 Solubilité des protéines	101
IV.2.2 Masses moléculaires des protéines de PCPB	103
IV.2.2.1 SDS-PAGE.....	103
IV.2.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique (GPC)	104
IV.2.3 Hydrophobicité de surface	107
IV.2.4 Tension de surface et tension interfaciale	108
IV.3 Propriétés techno-fonctionnelles des protéines de PCPB	109
IV.3.1 Propriétés gélifiantes	110
IV.3.2 Propriétés émulsifiantes	111
IV.3.3 Propriétés moussantes	114
IV.3.4 Pouvoir de rétention d'eau (PRE)	115

IV.4 Émulsification en continu sur l'unité rotor/stator : influence combinée de la formulation et des conditions opératoires.....	115
IV.4.1 Interactions protéines-polysaccharides : effet sur les propriétés rhéologiques et interfaciales de la phase aqueuse	116
IV.4.2 Analyse des résultats de l'émulsification en continu	119
IV.4.3 Comparaison entre les émulsions préparées avec le PCPB et Na-CN	125
IV.4.4 Conclusions	129
IV.5 Comparaison des caractéristiques de produits de charcuterie après substitution des Na-CN par les protéines de PCPB	130
IV.5.1 Mise en œuvre des ingrédients protéiques et rendement de cuisson.....	130
IV.5.2 Texture des produits finis.....	130
IV.5.3 Analyse sensorielle.....	132
IV.5.4 Conclusions	133
IV.6 Aptitude des protéines du PCPB au foisonnement.....	133
IV.6.1 Foisonnement en discontinu des formulations complexes.....	134
IV.6.1.1 Effet des polysaccharides	134
IV.6.1.1.1 Effet du xanthane et du guar	134
IV.6.1.1.2 Effet de la présence d'amidon.....	138
IV.6.1.2 Effet de l'addition d'huile	141
IV.6.2 Étude du foisonnement en continu	143
IV.6.3 Conclusions.....	147
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 149
REFERENCES.....	154

Introduction

Introduction

Il y a encore quelques années, la consommation traditionnelle des coproduits (abats) assurait une bonne exploitation de l'ensemble de la carcasse. Aujourd'hui, le contexte est totalement différent ; le marché est en baisse constante depuis une vingtaine d'années, essentiellement pour des questions d'image et de changements des habitudes alimentaires, et ce, malgré toutes les qualités nutritionnelles de ces produits (apport en protéines, vitamines, phospholipides, oligoéléments, peptides...). De plus, depuis l'interdiction de l'utilisation des farines animales dans les aliments pour animaux à cause de l'épidémie d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (maladie de la « vache folle »), des quantités considérables de coproduits animaux viennent grossir le stock de déchets produits par la filière viande. Chaque semaine, les abattoirs produisent 10000 tonnes de déchets supplémentaires qui deviennent de plus en plus difficiles à gérer. Sur ce total, les cimenteries ne peuvent éliminer que 2000 tonnes. Comme les possibilités d'entreposage sont de plus en plus limitées, il y a urgence à trouver des solutions pour remédier à ce gaspillage. En fait, on incinère aujourd'hui non seulement les déchets à hauts risques, ceux susceptibles de contenir des prions, mais également les coproduits qui ne trouvent pas de débouchés. Ainsi, parmi l'ensemble des coproduits de bœuf, de mouton, de porc ou de volailles, il subsiste une fraction importante de produits de qualité alimentaire susceptibles d'être revalorisés. Par exemple, ceux-ci sont riches en protéines qui représentent de 15% à 20% de la matière de ces coproduits animaux. Or, les protéines animales ont un rôle majeur sur la construction et l'entretien du corps humain, ainsi qu'une bonne valeur nutritionnelle car elles permettent d'équilibrer l'apport en acides aminés essentiels. Elles présentent également diverses propriétés fonctionnelles (solubilité, rétention d'eau, émulsification, gélification, épaississement, liant...), indispensables à la maîtrise de la qualité des produits élaborés par l'industrie alimentaire. D'après Young (1980), la proportion de protéines qui ne sont pas utilisées pour l'alimentation humaine dans les abats (estomac, poumon, sang...) d'une carcasse typique de bœuf (*Aberdeen Angus*) est actuellement d'environ 5 kg. Si l'on multiplie ce nombre par les 3 millions d'unités de bétail consommées annuellement rien qu'au Royaume-Uni, et si l'on y ajoute les mêmes données pour les moutons et les porcs, on obtient un total de 43000 tonnes de protéines, soit un équivalent de 215000 tonnes de viande maigre sans débouchés à l'heure actuelle dans ce seul pays.

Pour assurer la valorisation d'un tel potentiel, on ne peut plus se contenter de la consommation directe d'une partie des abats. Une des issues possibles serait de valoriser au maximum les protéines de ces coproduits de qualité alimentaire, par exemple en les utilisant comme des ingrédients fonctionnels et/ou biologiques. En effet, la combinaison de techniques d'ultrafiltration, de diafiltration et de microfiltration a permis en quelques années de faire passer le lactosérum du statut de déchet à celui de source de protéines utilisées dans de nombreux produits alimentaires. En revanche, les applications concernant la valorisation des protéines présentes dans les coproduits animaux restent très rares.

Pourtant, l'industrie alimentaire, et en particulier le secteur des produits carnés, a précisément besoin de toutes sortes d'ingrédients et d'additifs afin d'élargir sa gamme de produits et répondre à la demande d'un consommateur de plus en plus friand de produits transformés. En effet, les isolats et concentrats de protéines de viande sont potentiellement sous-utilisés par rapport aux ingrédients protéiques fonctionnels les plus courants (ovo-produits, protéines de lait ou d'origine végétale...) qui ont déjà des débouchés importants dans les produits carnés transformés (charcuterie de porc ou de volailles). Un avantage en termes d'utilisations pourrait provenir de la forme de présentation de ces ingrédients, par exemple par le développement de concentrés protéiques congelés, en poudre ou sous forme liquide, afin de répondre au mieux aux besoins des utilisateurs. Enfin, une autre voie possible serait d'orienter les protéines de coproduits animaux vers des débouchés spécifiques, par exemple les applications culinaires (sauce, fond de sauce...), les produits énergétiques pour sportifs, ou encore les bases aromatiques.

L'utilisation pratique de protéines issues de coproduits animaux pose toutefois un certain nombre de conditions, la première étant d'être capable d'extraire, de purifier et de concentrer ces protéines sous forme de concentrats ou d'isolats à un coût acceptable et de façon reproductible. Une fois les protéines extraites de ces coproduits, il faut encore que l'ingrédient dispose de propriétés qui lui permette d'appartenir à au moins l'une des quatre classes suivantes pour qu'il soit adapté à une application donnée :

1. Ingrédient nutritionnel (composition en acides aminés, apport en vitamines ou oligoéléments...);
2. Ingrédient organoleptique (incidence sur la couleur, le goût, la flaveur et la texture);
3. Ingrédient fonctionnel : propriétés technologiques d'hydratation (solubilité, capacité d'absorption et de rétention d'eau, dispersibilité...), propriétés de surface (pouvoir

émulsifiant, moussant...), propriétés de structure et de texture (viscosité, élasticité, cohésion, caractère liant, épaississant ou gélifiant) ;

4. Ingrédient biologique (propriétés enzymatiques, anti-oxydantes, bactériostatiques...).

A ces critères, il faut encore ajouter la nécessité de respecter des conditions compatibles avec le milieu dans lequel l'ingrédient va être utilisé (pH, force ionique, température, association possible avec les autres ingrédients d'une recette et contraintes liées au procédé de fabrication...).

Dans ce travail, l'accent sera donc mis en premier lieu sur les conditions d'extraction, de purification et de concentration des protéines des coproduits, avant de s'intéresser dans un deuxième temps à leurs fonctionnalités. A ce titre, nous avons étudié l'extraction des protéines issues de deux coproduits des animaux de boucherie : la « viande séparée mécaniquement » (VSM) de têtes de poulets et le poumon de bœuf. L'objectif clé est la mise au point d'un procédé simple et économique permettant d'obtenir des rendements d'extraction et de purification élevés tout en préservant les propriétés et les fonctionnalités des protéines. Ensuite, il s'agira de comparer et de classer ces protéines par rapport à des ingrédients de référence (tels que caséinates de sodium (Na-CN), protéines de lactosérum, de blanc d'œuf, de soja ou de plasma de bœuf...) actuellement utilisés comme ingrédients fonctionnels dans les produits carnés. Les propriétés fonctionnelles qui feront l'objet de notre étude sont celles généralement recherchées par les utilisateurs, à savoir : les propriétés gélifiantes, émulsifiantes et moussantes et le pouvoir de rétention d'eau. Enfin, nous chercherons également à estimer ces propriétés en présence d'autres ingrédients, comme les lipides et les polysaccharides dans des recettes modèles proches de celle utilisées dans le secteur des produits carnés transformés.

Pour la présentation de ce travail, nous avons donc retenu le plan suivant. Dans le chapitre I, nous présenterons une synthèse bibliographique dans laquelle nous ferons le point sur l'ensemble des travaux de recherche réalisés sur les méthodes d'extraction des protéines, ainsi que sur la caractérisation de leurs propriétés fonctionnelles les plus recherchées. Ce chapitre s'achèvera par une brève présentation des appareils mis en oeuvre pour conduire les deux opérations unitaires couramment utilisées dans l'industrie alimentaire que sont l'émulsification et le foisonnement. Dans le chapitre II, nous détaillerons les matériels et méthodes qui ont permis de réaliser l'ensemble des travaux de cette thèse. Ensuite, les résultats seront présentés dans deux chapitres distincts : le premier (chapitre III) est dédié à la VSM et le second (chapitre IV) concerne le poumon de bœuf. Si ces deux chapitres traitent de

l'extraction et de la purification des protéines, ainsi que de leurs propriétés fonctionnelles, le dernier fera une place plus importante à leur caractérisation physicochimique, ainsi qu'à leur aptitude à former une émulsion ou une mousse en discontinu et en continu dans des recettes qui s'approchent de plus en plus des produits réels. Pour finir, nous conclurons sur les travaux réalisés et présenterons les principales perspectives qui s'ouvrent à partir de nos résultats.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Synthèse Bibliographique

Chapitre I

Le terme « coproduit » désigne tout résidu d'un procédé de production ou de transformation qui peut être valorisé ou que l'on souhaite valoriser. Ce terme a été choisi pour remplacer celui de « déchet » qui a une connotation négative, ainsi que le terme dévalorisant de « sous-produit ». On rappellera en effet que le mot « déchet » vient de déchoir, du latin *cadere*, qui signifie « tomber » (ADEME¹, 1994). La valorisation des coproduits est donc définie comme le réemploi, le recyclage ou toute autre action visant à obtenir à partir des déchets des matériaux utiles et réutilisables.

La synthèse bibliographique de ce chapitre a pour objectif, dans un premier temps, de faire le point sur les coproduits issus de la filière viande. A titre d'illustration, un aperçu des principaux coproduits alimentaires déjà valorisés aussi bien dans la filière viande que dans les autres filières agroalimentaires sera également présenté.

Ensuite, nous décrirons les principales méthodes utilisées pour l'extraction et la purification des protéines alimentaires. Nous présenterons également les propriétés technofonctionnelles des protéines, ainsi que les ingrédients protéiques commerciaux de référence, parmi lesquels certains seront utilisés dans ce travail. Nous nous intéresserons aussi aux principaux types d'interactions entre les protéines et les autres familles d'ingrédients, en particulier les polysaccharides. Enfin, nous aborderons les aspects technologiques (incluant les procédés et équipements) de l'émulsification et du foisonnement, qui comptent parmi les opérations unitaires essentielles de l'industrie de la viande, notamment en charcuterie.

I.1 Les coproduits dans l'agroalimentaire

I.1.1 Généralités

Les coproduits organiques issus de la filière agroalimentaire, de la transformation agricole ou directement de l'agriculture revêtent une grande diversité : pulpe de betteraves, lactosérum, marc de raisin, déchets de légumes de conserverie, déchets de la viande dont

¹ ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

sang, os, etc. La production de ces déchets a tendance à augmenter en raison des changements des modes de consommation (transformation de plus en plus poussée des produits alimentaires, plats préparés, etc.). Selon le RESEDA², le pourcentage en volume des déchets organiques provenant de l'industrie agroalimentaire en France en 2007 représente environ 43% du volume total des déchets. Ces déchets sont répartis comme suit (figure I.1) :

- sucrerie : 21,1 % (mélasse, pulpe humide, écume, etc.) ;
- huilerie : 20,3% ;
- amidonnerie, féculerie : 18,1% ;
- industrie de la viande et des produits de la pêche : 12,7% ;
- meunerie : 12,3% ;
- laiterie et fromagerie : 11,2 % (essentiellement le lactosérum) ;
- pâtes alimentaires sèches : 1,6% ;
- autres : 2,7% (malterie, distillerie, etc.).

En général, l'industrie agroalimentaire (hors produits carnés) valorise majoritairement ses coproduits dans l'agriculture. En effet, la composition de ces coproduits leur confère très souvent la qualité de fertilisant organique, ainsi qu'une valeur nutritive pour l'alimentation animale. A titre d'illustration, les principaux domaines d'utilisation sont :

- les fertilisants à l'état brut (lisiers et fumiers, boues, eaux de lavage, etc.) ou après compostage (coques végétales, marcs, fruits et légumes, etc.) pour les sols agricoles ;
- l'alimentation animale pour l'élevage (fruits et légumes, etc.) ;
- l'emploi en qualité de matière première par un autre industriel (lactosérum pour la fabrication de fromages fondus, graisses et protéines en cosmétique et pharmacie, etc.).

² RESEDA : Réseau des organisations professionnelles et interprofessionnelles pour la Sécurité et la qualité des Denrées Animales

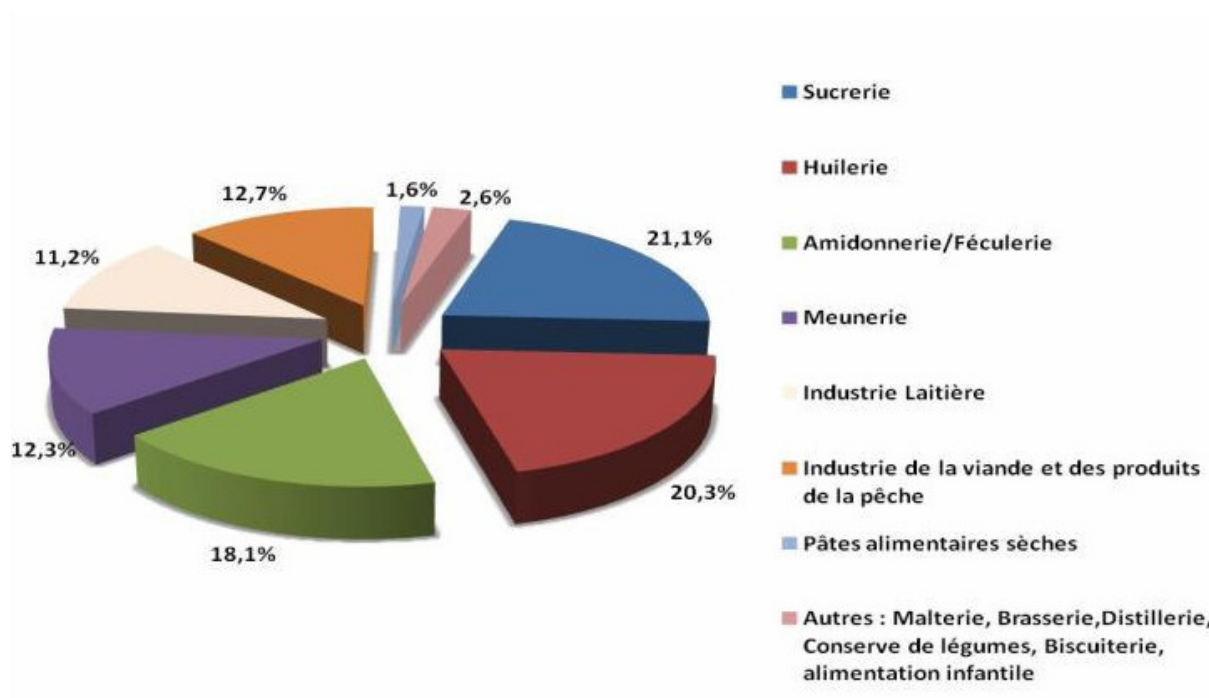


Figure I.1 : Répartition des déchets par filière en 2007.

I.1.2 Exemples de coproduits alimentaires déjà valorisés

Ci-dessous, nous présenterons le cas de deux coproduits, issus respectivement de l'industrie laitière (lactosérum) et de l'industrie de la viande (sang), qui sont passés du statut de déchet à celui d'ingrédient protéique commercial (ou de protéines dites « nobles »). Leur valorisation a également permis de limiter leur impact sur l'environnement.

I.1.2.1 Cas du lactosérum

Le lactosérum ou « petit lait » est le liquide obtenu au cours du processus de fabrication du fromage, ou plus exactement, de la précipitation des protéines de lait. Le lait est alors séparé en deux fractions : le *caillé*, matière semi-solide qui deviendra le fromage, et le petit lait dans lequel on trouve du lactose (70% à 75%), des protéines solubles (10% à 13%), des vitamines (thiamine ou vitamine B1, riboflavine ou vitamine B2 et pyridoxine ou vitamine B6) et des minéraux (essentiellement du calcium). La précipitation des protéines de lait peut être effectuée par des microorganismes (fermentation lactique), par l'addition directe d'acide (fabrication de caséines acides), ou par l'addition d'enzymes (fabrication des fromages par emprésurage). Le lactosérum peut donc être doux ou acide (Yada, 2004).

Au début du XX^{ème} siècle, les entreprises du secteur laitier éliminaient le lactosérum en le déversant dans les rivières. Depuis le développement des techniques membranaires

d'ultrafiltration et de microfiltration, le lactosérum est passé du statut de déchet à celui de source de protéines utilisées dans de nombreux produits. Ces protéines sont employées pour l'alimentation animale (bovins, porcins, volailles...) en mélange avec d'autres aliments (hachis de paille, drèches de brasserie, farines, etc.). En ce qui concerne l'alimentation humaine, elles ont tout d'abord des applications dans les produits à base de céréales : en effet, l'ajout de ces protéines améliore la qualité nutritive, ainsi que le goût de ces produits. On leur trouve également des applications dans divers produits laitiers, crémeux, pâteux ou à tartiner, en mélange avec de la crème, de la matière grasse et des additifs divers (stabilisants, sucre, sel, arômes, etc.). On les rencontre enfin dans les tablettes nutritives protéinées et les préparations pour nourrissons (www.fao.org/docrep).

I.1.2.2 Cas du sang

Contrairement à la plupart des coproduits animaux, le sang a connu un grand succès commercial à la fois par rapport à sa collecte et sa transformation (Ledward et al, 1984 ; Gómez-Juárez et al, 1999). Du fait de sa richesse en protéines (17% p/p en moyenne), on considère parfois le sang comme une « viande liquide ». En effet, il se compose de 60-70% p/p de plasma et de 30-40% p/p de cellule rouges. Le plasma contient de 6 à 8% de protéines. La teneur en protéines des cellules rouges est de 28-30%. La fraction constituée des cellules rouges reste cependant la moins utilisée dans les aliments. Le sang peut tout d'abord être utilisé directement, sans traitement, comme ingrédient ; dans ce cas, il est déshydraté par un procédé d'atomisation (Masters, 1976), ou bien il est concentré par coagulation. Le plasma est en général séparé des hématies par centrifugation. Les protéines peuvent être purifiées et concentrées par des techniques membranaires (Noordman et al, 2002 ; Dailloux et al, 2002). Le séchage, par atomisation à des températures atteignant 200°C, permet d'obtenir une poudre blanchâtre, sans odeur ni saveur. Les hématies récupérées sont déshydratées pour former de la farine de cruor. En revanche, les protéines du plasma sont essentiellement utilisées pour l'alimentation humaine, comme agent gélifiant et liant en charcuterie et en boulangerie et pour stabiliser les émulsions, ou dans l'alimentation animale, en particulier dans les aliments destinés aux porcelets.

I.1.3 Coproduits issus de l'industrie de la viande

La transformation d'un animal vivant en carcasse destinée à la consommation humaine génère à la fois des produits nobles essentiellement composés de tissus musculaires (viande) et des coproduits divers (abats, os, déchets organiques, etc.). Ces coproduits représentent un

volume important, en fait près de la moitié de la carcasse pour les espèces comme le mouton et le bœuf (tableau I.1). Or, seulement une partie de ces coproduits est valorisée dans l'alimentation humaine, directement ou après transformation. Le reste est soit détruit, soit utilisé sans transformation pour fabriquer des aliments pour animaux (comme des aliments humides pour carnivores), ou bien transformé en farines de viande et graisses animales.

Tableau I.1 : Proportion moyenne d'une carcasse (en pourcentage massique) consommée pour l'alimentation humaine en France

Mouton	Boeuf	Porc	Poule
52%	54%	62%	68%

Parmi les coproduits de la filière viande, ce sont ceux issus de l'abattage qui représentent la quantité annuelle la plus importante (figure I.2). Dans ce travail, nous allons nous intéresser à deux coproduits : la VSM (Viande Séparée Mécaniquement) de têtes de poulets et le poumon de bœuf. Ces coproduits ont été choisis en concertation avec l'ADIV³ et selon les recommandations de la filière des abattoirs en France. Nous allons donc donner un aperçu plus détaillé de chacun de ces deux coproduits.

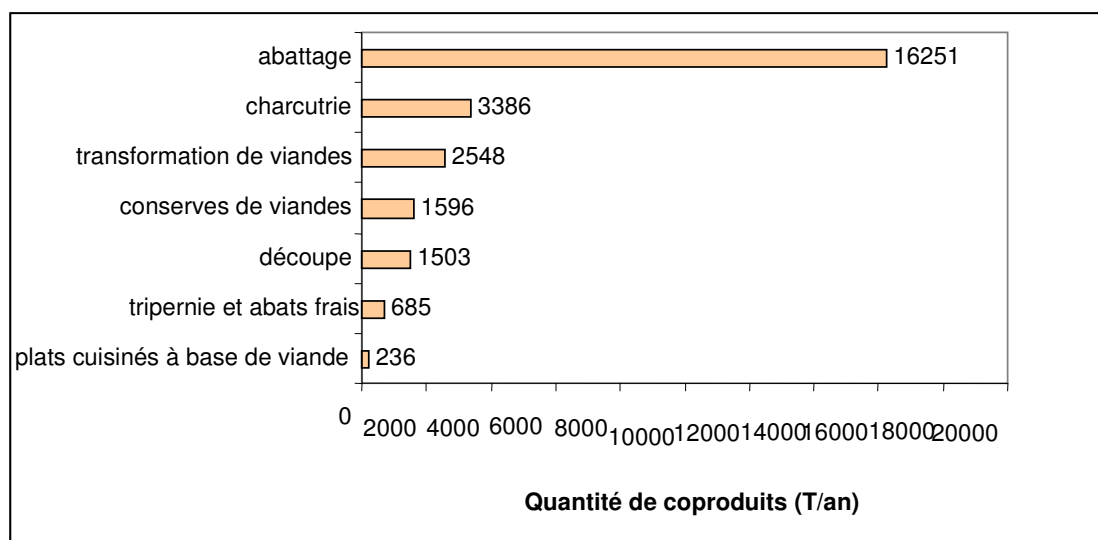


Figure I.2 : Quantité de coproduits issus de la filière viande en t/an

³ ADIV : Association de Développement de l'Institut de la Viande

1.1.3.1 Viande séparée mécaniquement (VSM)

La découpe et le désossage des carcasses des volailles laissent sur les parties osseuses une certaine quantité de viande qu'il est très difficile de récupérer manuellement. A la fin des années 1950, un fabricant japonais de matériel agroalimentaire a mis au point une machine permettant de séparer mécaniquement la chair du poisson des arêtes. Le concept de VSM est né à partir de cette découverte. Dans les années 70, les producteurs de viande de volailles ont équipé leurs abattoirs d'outils capables de produire de la VSM (Durand, 2005). Aujourd'hui, on distingue deux grands types de producteurs de VSM de volailles : ceux qui préparent et utilisent la VSM dans leurs propres productions et les sociétés spécialisées qui fournissent de la VSM aux industries de fabrication de produits à base de viande.

Il existe aussi des VSM de bœuf et de porc, mais la production de viande séparée de bœuf a fait l'objet d'une interdiction pour raisons d'hygiène, suite à l'épidémie dite de « l'encéphalopathie spongiforme bovine » (ESB) : par exemple, l'utilisation de la colonne vertébrale contenant la moelle épinière risquait d'entraîner le passage de cette dernière dans la VSM. En effet, la composition moyenne de la VSM dépend de la matière première d'origine. Par exemple, la présence des graisses naturellement trouvées dans le muscle et dans la peau, ainsi que celle de collagène, augmente leurs teneurs dans la composition finale de la VSM. Globalement, on retiendra que la VSM a trouvé de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire, par exemple dans les produits de charcuterie tels que les saucisses de Francfort (Ammar et Hmani, 2000).

1.1.3.2 Poumon de bœuf

Le poumon de bœuf est considéré comme un des coproduits issus des abattoirs et des ateliers de découpe et de transformation des viandes parmi les moins valorisés. Pourtant, il n'est pas identifié comme potentiellement à risque pour la transmission de l'ESB. Sa consommation en alimentation humaine varie en fonction des pays et de la culture culinaire. Il n'est cependant pas ou plus consommé dans de nombreux pays (<http://www.vet-lyon.fr>). Ses utilisations en charcuterie sont limitées, sauf dans quelques types des pâtés, terrines et galantines de catégorie 7 qui autorisent l'utilisation de tous les abats dans leurs préparations (Durand, 2005). Ce coproduit contient une fraction importante de protéines non valorisées (environ 18%) ; nous avons donc décidé d'étudier sa possible valorisation sous forme d'ingrédient par extraction de sa fraction protéique.

I.2 Extraction et purification des protéines

L'extraction des protéines est un moyen efficace pour séparer et récupérer les protéines des autres constituants non protéiques dans les produits initiaux pour avoir une mixture homogène et riche en protéines. Ces mixtures contiennent en général un taux de protéine plus élevé par rapport à leurs matières initiales. Pour isoler une certaine protéine dans cette mixture, on applique une méthode dite la purification de protéines. L'objectif de l'extraction et de la purification des protéines est de faciliter l'étude des propriétés de structure fonctionnalité de certaine protéine et en conséquence obtenir un produit convenable à l'utilisation dans les systèmes alimentaires. En effet, L'extraction et la purification de protéines de coproduits constituent un moyen efficace pour les valoriser. Nous résumerons donc les méthodes les plus utilisées dans la littérature pour extraire les protéines des coproduits. Nous insisterons en particulier sur les méthodes dites « douces », c'est-à-dire qui permettent de conserver au mieux les fonctionnalités des protéines extraites. Nous présenterons tout d'abord les facteurs affectant l'extraction des protéines, puis les principales étapes mises en œuvre au cours de cette opération. Ensuite, pour la purification et la concentration de ces protéines extraites, nous décrirons les deux principales méthodes disponibles : l'une est fondée sur l'utilisation de techniques membranaires (micro- et ultrafiltration), et l'autre repose sur la précipitation sélective des protéines.

I.2.1 Facteurs affectant l'extraction des protéines

Avant de s'intéresser en détail à l'étape d'extraction des protéines, il est nécessaire de connaître la composition des matières premières. En général, celles qui contiennent un taux élevé de lipides doivent être dégraissées, soit avant l'extraction des protéines (Nath et al, 1981 ; Ragab et al, 2004), soit après cette extraction (Wang, 1976 ; Sathe, 1982). L'élimination des lipides avant l'extraction des protéines est préférable parce que la présence des lipides peut provoquer la formation d'une émulsion et donc empêcher l'extraction des protéines. Il faut cependant mentionner que les propriétés fonctionnelles des protéines extraites peuvent être influencées par le type de solvant organique choisi pour extraire les lipides. Ainsi, Areas et al (1984, 1990 et 1993) ont démontré que l'utilisation de solvants organiques de polarités différentes pour extraire l'essentiel des lipides du poumon de bœuf modifie les propriétés fonctionnelles des isolats protéiques de ce coproduit. En pratique, le solvant utilisé pour extraire la matière grasse des matières premières dépend des types de lipides qu'elles contiennent (triglycérides saturés, insaturés, polyinsaturés ; phospholipides, etc.). Plusieurs solvants ont été proposés, comme l'hexane (Beuchat et al, 1977 ; Sathe et al,

1982), l'éther de pétrole (Sathe, 2002) ou un mélange de plusieurs solvants (polaire et apolaire) (Arêas, 1984, 1990 et 1993). Dans certains cas, les lipides peuvent également être extraits par pression mécanique (Shrestha et al, 2002). Les matières premières, telles que les muscles qui ont des teneurs en eau et en lipides élevées, devraient d'abord être broyées et lyophilisées avant que les lipides ne soient extraits par l'hexane ou l'éther de pétrole (Yada, 2004).

Un autre facteur qui affecte fortement l'extraction des protéines est la présence de composés phénoliques. Ceux-ci peuvent être toxiques, empêcher l'isolement des protéines, ou contribuer à la décoloration et donner un mauvais goût aux ingrédients ; ils peuvent aussi provoquer une diminution de la fonctionnalité des protéines isolées. Par exemple, les acides phénoliques peuvent réduire les interactions entre protéines qui ont un rôle essentiel sur les propriétés émulsifiantes et gélifiantes (Arntfield, 1996). Par conséquent, des traitements préliminaires sont en général nécessaires pour éliminer ces contaminants indésirables avant l'extraction des protéines. A titre d'exemple, les composés phénoliques du tournesol ont été éliminés en utilisant du méthanol à 80%, sans qu'un effet négatif n'ait été observé sur le rendement de récupération et la structure native des protéines (Gonzalez-Perez, 2002).

I.2.2 Principales étapes nécessaires à l'extraction des protéines

Afin d'extraire les protéines de produits solides ou semi-solides, la première étape consiste à les solubiliser dans un solvant approprié. L'objectif de cette première étape est donc de faire passer sélectivement la fraction protéique d'intérêt en solution et de maintenir les autres constituants en suspension. Le choix du solvant dépend de sa capacité à solubiliser la ou les fractions de protéines ciblées. Par exemple, il est connu qu'on peut fractionner une solution protéique en utilisant de l'eau distillée (albumines), une solution à 5% de NaCl (globulines), une solution eau-éthanol à 60-90% (prolamines ou gliadines), ou encore une solution de 0,4% de NaOH (glutélines). Pour extraire des protéines des plantes ou des graines de maïs, mais aussi des protéines de viande, l'utilisation d'une solution aqueuse alcaline a souvent été recommandée (Coffman et Garcie, 1977 ; Swingeler et al, 1978 ; Jelen et al, 1979 ; Gault et al, 1980 ; Ozimek et al, 1986 ; Akintayo et al 1999 ; Boles et al, 2000 ; Ragab et al, 2004). On trouve également quelques cas où l'extraction des protéines de viande a été réalisée à partir de solutions de polyphosphates ou de NaCl (Haluk et al, 1984 ; Nuckles et al, 1990 ; Arêas et al, 1993 ; Boles et al, 2000 ; Xiong et al, 2000), ou parfois des solutions de SDS (Gault et al, 1980). En revanche, les solvants organiques sont rarement utilisés pour

extraire les protéines à cause de leurs effets négatifs sur la structure et les fonctionnalités de celles-ci. L'extraction des protéines peut également être conduite par hydrolyse enzymatique ; l'efficacité de cette méthode dépend de l'action des enzymes utilisées (donc de la variété des enzymes : protéolytiques, collagénolytiques ou élastolytiques) qui a pour but de libérer les protéines de leurs matrices et donc d'améliorer leur solubilité sans pour autant provoquer leur dénaturation. Cette méthode a été utilisée pour extraire les protéines de la VSM de dinde (Fonkwe et Singh, 1996) et les protéines de poumon de bœuf (Webster et al, 1982) ; même si le rendement d'extraction est très élevé pour le poumon de bœuf (environ 80%), cette méthode reste assez coûteuse et difficile à contrôler.

En conclusion, bien que largement étudiées, les démarches que nous venons de décrire ont rarement fait l'objet d'une optimisation dans l'optique d'une application industrielle, notamment par rapport à la durée du traitement et au rapport massique coproduit/solution. Or, ces informations sont indispensables pour envisager une application industrielle.

I.2.3 Concentration/purification des protéines

Une fois les protéines en solution, il est tout d'abord nécessaire de les purifier afin d'éliminer les impuretés, puis de les concentrer en éliminant l'eau en excès. Ces opérations sont parfois suivies par un fractionnement des protéines pour isoler une protéine d'intérêt. Le fractionnement s'effectue en général par des techniques chromatographiques ou par électrophorèse. Le fractionnement ne sera pas développé dans ce travail car notre objectif reste la récupération des protéines d'un coproduit dans leur ensemble, ainsi que l'étude des propriétés fonctionnelles de cet ensemble et non de ses protéines prises séparément. Nous nous intéresserons donc dans la section suivante aux deux principales méthodes utilisées pour la purification et la concentration des protéines.

I.2.3.1 Concentration/purification par procédés membranaires

Les procédés de séparation membranaires sont fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire, notamment dans l'industrie laitière (pour la concentration des protéines de petit lait, le contrôle de la teneur en protéines du lait, l'élimination des bactéries, *etc.*). On recense également quelques applications dans le domaine des boissons (vin, bière, jus de fruit, *etc.*). Concernant les plantes et les végétaux, quelques rares travaux publiés récemment sur les procédés membranaires démontrent la possibilité d'obtenir des ingrédients protéiques, par exemple de jojoba (Nabetani et al, 1995).

Les procédés membranaires les plus utilisés dans l'industrie alimentaire sont la microfiltration (MF) et l'ultrafiltration (UF). Il s'agit de techniques de filtration sous l'effet d'un gradient de pression qui permettent de séparer des molécules en fonction de leurs masses moléculaires. Excepté l'osmose inverse (figure I.3), leurs principes de fonctionnement sont donc similaires, la différence se situant au niveau de la taille des objets à séparer. En gros, la microfiltration retient les particules et objets dont les tailles sont supérieures à 0,1-1 μm et l'ultrafiltration, ceux dont les tailles sont supérieures à 0,01-0,1 μm .

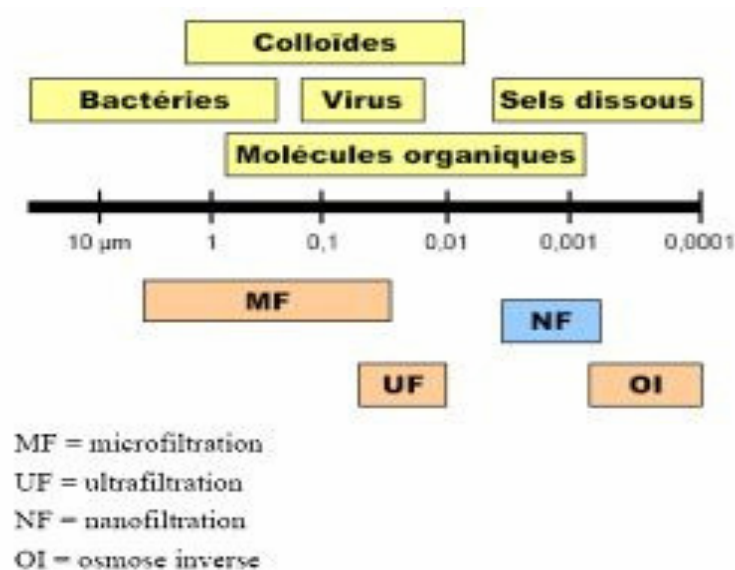


Figure I.3 : Procédé à utiliser en fonction de la taille des « objets » à séparer

Les utilisations de la MF et l'UF dans l'industrie laitière ont fait l'objet de nombreux travaux et brevets dans la littérature. Daufin et al (2001) ont démontré que la microfiltration (avec coupure à 100 nm) permet de séparer les micelles de caséines des protéines solubles dans le lait écrémé. Cette séparation est très importante dans la production des fromages (rétenant) et pour l'isolement (voire le fractionnement) des protéines solubles (notamment β -lactoglobuline et α -lactalbumine) dans les perméats. Les techniques de séparation membranaires ont aussi été utilisées dans l'industrie de la viande, notamment pour valoriser les protéines de plasma sanguin. Noordman et al (2002) ont étudié les effets de la force ionique (entre 0,05 et 0,15 M de NaCl) et du pH (de 3 à 8) sur l'ultrafiltration des solutions protéiques de sérum albumine bovine ; leurs résultats montrent que les débits de perméats augmentent avec la diminution de la force ionique et aux valeurs de pH éloignées du point isoélectrique de la sérum albumine. Le choix du seuil de coupure de la membrane utilisé a également fait l'objet de nombreux travaux, comme par exemple ceux de Masselot (2005) qui

a utilisé la microfiltration (avec coupure à 1,4 μm) suivie par une ultrafiltration (avec coupure à 100 ou 20 nm) pour purifier et concentrer des extraits protéiques de poumon de porc : le but de la MF est de retenir les bactéries et les matières grasses (c'est une étape de purification), alors que l'UF vise à éliminer l'eau par concentration. Les résultats ont montré que lorsque la MF était suivie par l'UF-20 nm, le rendement de récupération protéique était un peu plus élevé (62,8%) que lorsque la MF était suivie par une UF-100 nm (58,1%). Cependant, les débits de perméat mesurés sur la membrane à 20 nm étant beaucoup plus faibles que sur la membrane de seuil de coupure 100 nm dans la gamme de pression étudiée, les conclusions de Masselot (2005) étaient que seule l'utilisation de cette dernière était acceptable d'un point de vue procédé pour concentrer les protéines. Une alternative proposée par l'auteur a été d'utiliser directement une UF à 100 nm en s'affranchissant de la MF : le rendement de récupération protéique dans le rétentat était alors très élevé (93,8%), mais au prix d'une pureté plus faible des protéines puisque les bactéries et l'essentiel des matières grasses n'étaient alors plus séparées de la fraction protéique.

1.2.3.2 Concentration/purification des protéines par précipitation

La purification des protéines à l'échelle industrielle peut également s'effectuer par précipitation sélective des protéines. Cette précipitation peut être provoquée par plusieurs méthodes (www.chimie-biochimie.umoncton.ca) :

1 - en jouant sur le pH ou par l'ajout d'électrolytes :

Si les protéines en solution sont électriquement chargées de la même façon, elles ont tendance à se repousser et à rester solubles. Au contraire, si elles sont électriquement neutres, cette répulsion disparaît et leur agrégation devient possible, ce qui peut conduire à leur précipitation. Ce phénomène peut se produire en jouant sur le pH et en le déplaçant au point isoélectrique pI (*i.e.* de charge nulle) des protéines. L'ajout d'électrolytes (sels très solubles qui ne modifient pas le pH) conduit à un résultat similaire, mais par un effet d'écran ; l'augmentation de la force ionique de la solution atténue les répulsions électrostatiques : les cations peuvent donc « neutraliser » les charges négatives des chaînes latérales des acides aminés, alors que les anions « neutralisent » les charges positives, ce qui permet aux protéines de s'agréger et réduit substantiellement leur solubilité. Dans les deux cas, pH ou électrolytes, les protéines d'un mélange ne précipiteront pas toutes en même temps puisque leurs pI respectifs ou bien le nombre et la nature de leurs charges à $\text{pH} \neq \text{pI}$ ne sont pas identiques. Ce type de précipitation s'appelle « précipitation différentielle », ou « précipitation fractionnée ». Il est considéré comme une précipitation « douce » car il préserve généralement l'intégrité

fonctionnelle des protéines. Cette méthode a été largement utilisée dans la littérature pour la concentration des protéines : par exemple par Batista et al (1999) pour la récupération des protéines de déchets de poissons. Ces auteurs ont effectué une solubilisation des protéines dans une solution alcaline (NaOH), puis ils les ont récupérées par précipitation en milieu acide par un ajout d'HCl ; comme alternative, ils ont proposé une solubilisation en présence de Ca(OH)_2 suivie par une précipitation par ajout d' H_3PO_4 : la première méthode s'est cependant révélée la plus efficace, avec un rendement protéique de 93,2% contre 91,8% pour la seconde.

2- en ajoutant des solvants organiques (acétone, phénol) ou des acides forts concentrés :

Il s'agit ici de jouer sur les modifications de la structure spatiale des protéines et donc sur leur dénaturation. Il est bien connu qu'à l'état natif, ce sont les groupes latéraux des acides aminés qui composent les protéines qui leur permettent d'être solubles en milieu aqueux. Les protéines adoptent donc une structure tertiaire dans laquelle les chaînes latérales chargées (glutamine, acide aspartique, lysine, arginine. etc.) ou faciles à hydrater (sérine, thréonine, etc.) sont dirigées vers l'extérieur de la macromolécule, maximisant leur contact avec le milieu aqueux. En revanche, leurs groupements hydrophobes (phénylalanine, tryptophane, proline, etc.) sont généralement enfouis à l'intérieur de la structure tridimensionnelle de la macromolécule, minimisant leur contact avec l'eau. La dénaturation brise cette organisation et ramène en surface les groupements hydrophobes de la macromolécule qui vont pouvoir interagir avec ceux des autres protéines dénaturées et favoriser l'agrégation des protéines. L'agrégation diminue la solubilité des protéines, qui est également réduite par la présence des groupements hydrophobes exposés au milieu aqueux. Les solvants organiques (acétone, phénol, etc.), les acides forts peu concentrés, voire certains traitements thermiques bien contrôlés (couple temps/température) sont bien connus pour favoriser la dénaturation et l'agrégation des protéines. Toutefois, ce type de précipitation est appelé « précipitation totale » car il vise à éliminer l'ensemble des protéines d'une solution, mais comme il s'accompagne de conditions plutôt draconiennes qui dénaturent irréversiblement les protéines, les risques de perte de fonctionnalités sont alors très élevés.

3 - en ajoutant des produits qui ont une grande affinité pour l'eau, comme par exemple le polyéthylène glycol, de manière à réduire la quantité d'eau disponible pour hydrater les protéines, ce qui tend à les faire précipiter (Boland, 2002).

I.3 Propriétés fonctionnelles des protéines

Les propriétés fonctionnelles sont définies comme l'ensemble des propriétés physiques et chimiques affectant le comportement des protéines dans une formulation lors de la production, l'entreposage et la consommation de produits alimentaires (Kilara, 1984). La connaissance des propriétés fonctionnelles d'un ingrédient permet d'améliorer les procédés de fabrication des aliments car elle donne accès à son domaine d'utilisation et permet de prévoir ses principaux effets dans une formulation ; elle permet aussi la comparaison de différents ingrédients en concurrence. En général, les propriétés techno-fonctionnelles des protéines sont classées en trois groupes, selon les interactions mises en jeu :

1. *les propriétés d'hydratation*, comme la solubilité ou la rétention d'eau, dépendent des interactions protéines-eau ;
2. *les propriétés de surface* régissent les interactions protéines-lipides et protéines-air, en particulier les pouvoirs moussant et émulsifiant ;
3. *les propriétés de texturation*, comme la gélification ou la coagulation, dépendent des interactions protéines-protéines.

Ces propriétés font principalement intervenir les liaisons chimiques suivantes :

- *les liaisons « hydrogène »* qui s'établissent des interaction entre un atome électronégatif possédant un doublet électronique et un atome d'hydrogène : c'est par exemple le cas entre les chaînes peptidiques et les résidus de glutamine ; ce sont aussi les liaisons hydrogène qui régissent les interactions des protéines avec l'eau et qui influencent leur solubilité.
- *les interactions électrostatiques* qui s'établissent entre les acides aminés anioniques (acide glutamique et acide aspartique) et les acides aminés cationiques (lysine, histidine, arginine et tyrosine) : ce type de liaison est très dépendant du pH.
- *les interactions hydrophobes* qui s'établissent entre les acides aminés branchés (valine, leucine, isoleucine), les acides aromatiques (tryptophane et phénylalanine) des protéines et les graisses. Elles sont responsables des propriétés émulsifiantes et moussantes.
- *les liaisons covalentes* (ponts disulfures, isopeptides de type γ -glutamyl- ϵ -lysine et lysinoalanine...) qui assurent une certaine rigidité à la matrice protéique.

Un des objectifs que nous nous sommes fixés dans ce travail est d'estimer les propriétés fonctionnelles des protéines extraites de coproduits afin de les positionner par rapport à des protéines commerciales de référence. Dans cette partie, nous décrirons donc les méthodes citées dans la littérature pour caractériser les fonctionnalités des protéines ; il s'agira ensuite

de choisir les plus adaptées au cas des protéines étudiés dans ce travail. En fait, il y a plus de 30 ans, Pearce et Kinsella (1978) avaient déjà mentionné le besoin d'établir des méthodes standardisées pour quantifier les propriétés techno-fonctionnelles des protéines parce qu'il existait déjà une multitude de méthodes de caractérisation disponibles ; toutefois, les résultats obtenus pouvaient fortement différer selon la méthode choisie. En pratique, cela s'est traduit par des résultats qui n'avaient de sens qu'en terme « comparatif », à méthode fixée par rapport à une référence qui pouvait être une protéine purifiée ou un ingrédient protéique commercial. La diversité des méthodes de caractérisation des propriétés techno-fonctionnelles n'a toujours pas disparu à ce jour, mais on peut cependant en distinguer un certain nombre qui sont reprises par la majorité des travaux publiés.

I.3.1 Pouvoir de rétention d'eau (PRE)

I.3.1.1 Définition

Le pouvoir de rétention d'eau (PRE) des protéines est un des critères qui détermine la qualité de texture des produits alimentaires, notamment pour les produits carnés et en particulier après cuisson : ainsi, le rendement en production et la qualité sensorielle du produit dépendent directement de son PRE.

I.3.1.2 Méthodes de caractérisation

Dans la littérature, plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour la détermination du PRE des ingrédients protéiques (Hutton et Campbell, 1981) :

1. Méthode fondée sur la mesure de l'humidité relative Il s'agit de chiffrer la quantité d'eau absorbée à une a_w donnée (ou vice versa) ; cette méthode est utile pour évaluer l'hygroscopie d'une poudre protéique.
2. Méthode de gonflement Dans ce cas, l'appareil de Baumann est utilisé pour la mesure de PRE. Cet appareil consiste en un tube capillaire gradué fixé à un filtre en verre fritté (figure I.4). La poudre protéique est placée sur le filtre et absorbe spontanément l'eau contenue dans le tube capillaire situé sous le filtre. Par cette méthode, on peut déterminer à la fois la vitesse et l'étendue de l'hydratation ; elle a par exemple déjà été utilisée par Hoffman (1975) pour mesurer le PRE de la viande.
3. Méthode par saturation d'eau Elle consiste à mesurer la quantité d'eau juste nécessaire pour établir un état de saturation de la protéine en eau ;
4. Méthode d'excès d'eau Il s'agit d'exposer les échantillons protéiques à de l'eau en excès par rapport à celle que la protéine peut fixer, puis à filtrer ou à appliquer une

force centrifuge ou de compression modérée pour séparer l'eau en excès. Le PRE s'obtient en mesurant la quantité d'eau non retenue par les protéines.

La capacité d'absorption-rétention d'eau de diverses préparations protéiques estimée par les deux dernières méthodes citées est reportée dans le tableau I.2. En effet, la majorité des travaux de la littérature utilise la méthode par excès d'eau pour la détermination de PRE des protéines. Celle-ci est considérée comme représentative car dans les préparations industrielles, les protéines sont souvent dissoutes en premier dans un excès d'eau, avant l'ajout des autres ingrédients. D'autre part, cette méthode est simple à mettre en œuvre et fiable. Nous l'avons donc retenue dans notre travail pour la détermination du PRE des protéines.

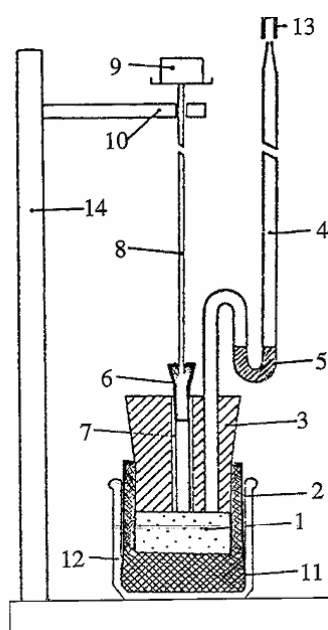


Figure I.4 : Appareil de Baumann pour la mesure du PRE (Hoffmann, 1975). 1 : fritté de verre ; 2 : anneau plastique ; 3 : bouchon en silicone ; 4 : tube ascendant ; 5 : liquide indicateur ; 6 : bouchon ; 7 : tube en verre ; 8 : et 9 : tige avec plateau et poids ; 10 : support ; 11 : place d'échantillon ; 12 : récipient ; 13 : volet de fermeture ; 14 : support.

Tableau I.2 : Capacité d'absorption-rétention d'eau de diverses protéines (Cheftel et al, 1985)

Type de protéines	Capacité de rétention d'eau (g d'eau/g d'échantillon initial)	
	En présence d'un excès d'eau	En saturation
Concentré protéique de pois	1,05	1,31
Concentré protéique de soja (Promosoy 100)	3,10	3,00
Isolat de soja (Promine D)	3,50	3,85
Isolat de soja (Supro 620)	6,70	5,50
Concentré protéique de colza	4,50	3,29
Caséinates de sodium	0,00	2,33
Blanc d'œuf	1,30	0,96
Concentré protéique de lactosérum	0,00	0,97

1.3.1.3 Facteurs influençant le pouvoir de rétention d'eau

Le PRE d'une protéine est influencé par de nombreux facteurs, tels que les interactions protéine-protéine et protéine-eau (Chou et Morr, 1979 ; Kinsella, 1976), sa pureté, le pH, la température, la durée d'hydratation et la force ionique du milieu étudié. En général, le PRE s'accroît avec la concentration en protéines. Lorsque le pH s'éloigne du pI, le PRE augmente puisque les interactions entre protéines sont maximales au pI, ce qui provoque une diminution de leur pouvoir d'hydratation et de gonflement. L'augmentation de la température décroît au contraire la fixation de l'eau par les protéines parce que le chauffage peut provoquer leur dénaturation et leur agrégation, ce qui peut réduire la disponibilité des groupements polaires pour fixer l'eau. Aux faibles concentrations en sels, l'hydratation des protéines peut s'accroître. Pour les forces ioniques élevées, les interactions eau-sels peuvent prédominer au détriment des interactions eau-protéine, ce qui aboutit à une déshydratation des protéines.

On notera enfin que le pouvoir de rétention d'eau des protéines de coproduits animaux a été très peu étudié dans la littérature. La majorité des travaux concerne la détermination du PRE des protéines myofibrillaires ou bien directement de celui du produit transformé, tel que la saucisse avant et après cuisson. Par exemple, Whiting et al (1984) ont montré que le PRE de la saucisse de Francfort diminue lorsque la concentration en NaCl dépasse 2% (p/p) et lorsque la température de cuisson dépasse 60°C ; de même, Fonkwe et Singh (1996) ont estimé le PRE des protéines extraites par voie enzymatique de la VSM de dinde à environ 0,5 mL d'eau/g de protéines.

I.3.2 Propriétés gélifiantes des protéines

I.3.2.1 Définition

L'aptitude d'une protéine à la gélification joue un rôle majeur dans la préparation de nombreux aliments, comme les produits à base de viande et de poisson, ou dans divers produits laitiers, etc. Un gel est par définition un réseau continu tridimensionnel de molécules ou particules qui absorbe son solvant. Pour obtenir un gel, les protéines doivent d'abord se déplisser, puis subir une dénaturation en général irréversible et s'agréger. Les agrégats ainsi formés peuvent alors se lier par des liaisons non-covalentes ou covalentes (comme les ponts disulfures) pour former un réseau tridimensionnel.

I.3.2.2 Méthodes de détermination des propriétés gélifiantes des protéines

Les mécanismes provoquant la formation d'un gel peuvent être chimiques (effet de pH, ajout de calcium...), enzymatiques ou bien physiques, tels que les traitements thermiques ou hautes pressions (Famelart et al, 1998). La température de gélification, la concentration minimale de gélification et la force de gel sont les trois grandeurs clés pour caractériser les propriétés gélifiantes d'une protéine.

L'analyse du comportement thermique et notamment la détermination de la température de gélification des protéines alimentaires s'effectue le plus souvent par microcalorimétrie différentielle (Ma et Harwalker, 1990), mais aussi parfois par des mesures rhéologiques (Culioli et al, 1990). La concentration minimale de gélification est en général déterminée expérimentalement, en préparant des solutions protéiques à diverses concentrations et en les chauffant longuement au-delà de la température de gélification ; le gel se forme alors au cours du refroidissement (Sathe et Salunkhe, 1981). Cette méthode a été utilisée par Masselot (2005) pour la détermination de la concentration minimale de concentrées protéiques de poumons de porcs et de cœurs de volailles.

En dépit de leur teneur en eau très élevée, les gels ont en général un comportement rhéologique de solide viscoélastique. Divers instruments peuvent être utilisés pour déterminer des grandeurs physiques caractéristiques correspondant à une force de gel. Les méthodes les plus utilisées pour évaluer la fermeté d'un gel sont les tests de pénétration ou de compression. Il existe cependant des méthodes alternatives, comme par exemple la mesure du module d'élasticité en cisaillement (Culioli et al, 1990) ; il suffit alors d'étudier en mode dynamique les propriétés rhéologiques des solutions protéiques, par exemple en suivant l'évolution du module d'élasticité en fonction de la température appliquée. Parmi les méthodes mentionnées,

nous avons finalement retenu celle proposée par Culioli et al (1990) car elle est simple et permet d'obtenir simultanément la température de gélification et la force de gel.

1.3.2.3 Facteurs influençant la formation du gel

La propension des protéines à former un gel dépend des conditions environnementales, comme la température, le pH et la force ionique. Par exemple, Dailloux et al (2002) ont étudié l'influence du pH et de l'ajout de NaCl sur les propriétés gélifiantes du plasma de bœuf ; leur étude a montré que l'augmentation de pH de 4 à 7,8 augmente la température de gélification de 35°C à 54°C, alors que la présence de sel entre 0,2% et 1,65% (p/p) n'a pas d'influence à ces températures. D'autre part, la formation du gel dépend fortement du type de protéine, de sa concentration et de la méthode par laquelle elle a été extraite.

Comme pour la rétention d'eau, rares sont les travaux sur la gélification des protéines extraites des coproduits animaux, la majorité concernant les protéines myofibrillaires dans le cas de la viande. Ainsi, de Lamballerie et al (1990) ont étudié la gélification thermique des protéines myofibrillaires issues de VSM de dinde par mesure rhéologique ; leurs résultats montrent que le module conservatif augmente fortement à 49°C, puis qu'il suit d'une croissance régulière jusqu'à 80°C à pH 6,5 et avec une force ionique élevée (0,6 M NaCl). De même, Fonkwe et Singh (1996) ont étudié les propriétés gélifiantes des protéines extraites de la VSM de dinde par voie enzymatique : leurs résultats ont toutefois montré qu'une solution à 20% (p/v) de ces protéines gélifiait difficilement, même sous l'effet d'un cycle de chauffage à 100°C pendant 30 min suivi d'un refroidissement à 10°C. Enfin, Boles et al (2000) ont montré que l'utilisation dans des saucisses de protéines extraites d'os de bœuf donne les mêmes propriétés gélifiantes et parfois mieux que les protéines commerciales lorsqu'elles sont utilisées dans les mêmes recettes de saucisses.

1.3.3. Propriétés émulsifiantes

1.3.3.1 Aspects généraux de la formation et de la stabilisation des émulsions

Une émulsion est une dispersion colloïdale de gouttelettes de liquide dans une phase continue dans laquelle elles sont immiscibles. D'un point de vue quantitatif, une émulsion est caractérisée par la fraction volumique de la phase dispersée (ϕ) et la distribution de tailles des gouttelettes qui peut être assez large. Le processus de formation d'une émulsion s'appelle l'*émulsification*. L'émulsification consiste donc à transformer un système à deux phases séparées en un système pseudo-homogène caractérisé par une aire interfaciale importante

(McClements, 1999). La plupart des émulsions alimentaires sont de type « huile dans eau » (H/E), mais parfois aussi de type « eau dans huile » (E/H). Dans la plupart des cas, le diamètre des gouttelettes est compris entre 0,1 et 50 μm , avec un degré variable de dispersion autour d'une valeur moyenne. La formation de gouttelettes émulsifiées se traduit donc par la création d'une aire interfaciale qui augmente proportionnellement comme l'inverse du diamètre des gouttelettes pour une même quantité de phase dispersée. La création de cette aire interfaciale exige un apport d'énergie minimal ΔE_s proportionnel à l'augmentation de surface ΔA et à la tension interfaciale σ selon l'équation suivante :

$$\Delta E_s = \gamma \cdot \Delta A \quad (\text{I-1})$$

Cela se traduit à l'équilibre par l'apparition d'une surpression ΔP dans les gouttelettes appelée pression de Laplace. Dans le cas d'une gouttelette sphérique de diamètre d , celle-ci peut être estimée par l'équation suivante :

$$\Delta P = \frac{4\sigma}{d} \quad (\text{I-2})$$

Pour une gouttelette d'un micromètre, l'ordre de grandeur de la pression de Laplace est de 10^5 Pa. Pour diminuer les besoins en énergie, des agents de surface appelés agents émulsifiants sont souvent utilisés lors de la préparation des émulsions, parmi lesquels certains sont des protéines.

L'équation I-1 montre que les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui tendent inévitablement vers une séparation de phase puisque l'augmentation de l'aire interfaciale entraîne une augmentation de l'énergie libre du système, mais aussi celle des contraintes mécaniques aux interfaces (équation I-2). La stabilité d'une émulsion est donc purement liée à sa cinétique de déstabilisation ; elle joue donc un rôle essentiel sur la durée de vie des aliments. Il existe cependant plusieurs modes de déstabilisation des émulsions :

- la *floculation* qui est le plus souvent une agrégation physique par des forces de van der Waals des gouttelettes qui conservent cependant leur individualité ; elle est généralement réversible, mais peut favoriser à terme d'autres phénomènes irréversibles tels que la coalescence. Ce comportement s'explique à partir d'un bilan de forces par la théorie DLVO⁴. Il existe aussi des types particuliers de floculation, tels que la *floculation par pontage* provoquée par l'adsorption simultanée de polymères de haute masse molaire sur plusieurs gouttelettes, ou encore la *floculation par déplétion* qui est un phénomène osmotique résultant d'une « compétition » entre les volumes d'exclusion respective des

⁴ Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek

gouttelettes et d'un autre colloïde qui ne peut pas s'adsorber sur celles-ci (micelles, macromolécules...) (Dickinson, 1996 ; Euston et al, 1999 ; Srinivasan et al, 2000).

- la *diffusion* ou *mûrissement d'Ostwald* qui correspond à une évolution lente de la distribution des tailles des gouttelettes vers les tailles les plus élevées. Il s'agit d'un phénomène d'origine thermodynamique lié à la différence de potentiel chimique des gouttelettes en fonction de leur taille (et en pratique à la pression de Laplace) qui favorise à terme le *crémage*, mais qui est souvent négligeable, sauf lorsque la phase dispersée est légèrement soluble dans la phase continue (Hunter et al, 1987 ; Ettelaie et al, 2003 ; Dutta et al, 2004).
- le *crémage* qui est une migration ascensionnelle des gouttelettes sous l'effet de la gravité ou d'une centrifugation due à la différence de masse volumique entre les deux phases. Il aboutit à la formation d'une couche concentrée en matières grasses à la surface de l'émulsion. Il est réversible tant que la surconcentration en gouttelettes près de la surface ne provoque pas la coalescence. En première approximation, le *crémage* gravitaire suit la loi de Stokes :

$$V = \frac{2r^2 g \Delta \rho}{9\mu} \quad (\text{I-3})$$

où V est la vitesse terminale ascensionnelle de la gouttelette, r est son rayon, g est l'accélération de la pesanteur, $\Delta \rho$ la différence de masse volumique entre les deux phases et μ la viscosité dynamique de la phase continue.

- la *coalescence* qui est la fusion irréversible de plusieurs gouttelettes de l'émulsion pour former une grosse gouttelette unique. En l'occurrence, la coalescence est le processus inverse de l'émulsification, c'est-à-dire l'inverse de la formation de l'émulsion.
- l'*inversion de phase* qui est le passage brutal d'une émulsion E/H vers H/E ou inversement. Ce phénomène est rarement spontané dans le domaine de l'alimentaire, mais peut se produire sous l'action d'un traitement thermomécanique ou d'un ajout d'additifs (notamment d'agents émulsifiants).

Le schéma de déstabilisation le plus fréquemment observé pour les émulsions alimentaires est présenté sur la figure I.5

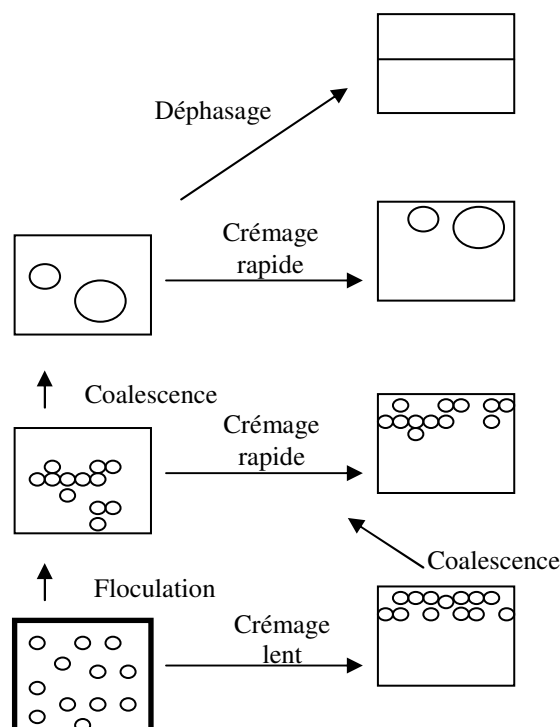


Figure I.5 : Schéma classique des mécanismes de déstabilisation d'une émulsion.

Globalement, la stabilité d'une émulsion est favorisée par une faible tension interfaciale, une fraction volumique de phase dispersée modérée, une réduction de la taille des gouttelettes, une augmentation de la viscosité et de l'élasticité de la phase dispersante, une couche adsorbée épaisse et stable qui engendre des répulsions électrostatiques ou une incompatibilité stérique entre les membranes de deux gouttelettes.

1.3.3.2 Méthodes de détermination des propriétés émulsifiantes des protéines

Pour déterminer le rôle d'une protéine dans une émulsion ou pour comparer les propriétés émulsifiantes des protéines, trois paramètres sont très largement utilisés (Hall, 1996) :

1 – La capacité émulsifiante (CE)

Elle est définie comme la quantité maximale d'huile pouvant être émulsifiée par gramme de protéine avant que ne se produise l'inversion de phase. Pour l'estimer, une solution protéique est agitée à vitesse constante pendant que l'on ajoute continuellement de l'huile ou de la graisse fondue. L'inversion de phase peut être révélée par plusieurs indicateurs :

- le changement d'apparence visuelle : pour faciliter la détection visuelle de l'inversion de phase, Marshall et al (1975) ont ajouté un colorant à l'huile avant émulsification ;

- la chute brutale de la viscosité (Swift et al, 1961) ;
- l'augmentation brutale de la résistance électrique (Webb et al, 1970 ; Satterlee et al, 1973 ; Kato et al, 1985 ; Tejada et al, 1987 ; Thakur et al, 2008).

La tendance à l'inversion de phase s'accroît notablement quand la fraction volumique de l'huile ϕ dépasse 0,74 (Halling, 1981 ; Dickinson, 1982). Selon Cheftel et al (1985), les valeurs de ϕ au point d'inversion (ϕ_i) varient en général entre 0,65 et 0,85 en présence de protéines.

En fait, il semble que la détermination de la capacité émulsifiante des protéines par la méthode visuelle de séparation de phase ne soit pas précise et que les résultats obtenus dépendent fortement de l'opérateur qui réalise le test. D'autre part, le suivi de l'émulsification par la mesure de viscosité est difficile à automatiser car il nécessite la mesure de la viscosité après chaque ajout de l'huile ; de plus, la détermination du point d'inversion de phase (chute de viscosité) n'est pas toujours très précise. Nous avons donc retenu le suivi de la conductivité de l'émulsion (Thakur et al, 2008) pour notre travail car il s'agit d'une méthode à la fois simple et précise.

2 – L'activité émulsifiante (EA)

L'activité émulsifiante (EA) mesure la capacité des protéines à augmenter l'aire interfaciale d'une émulsion à fraction volumique fixée. Elle augmente donc quand la taille des gouttelettes diminue (*i.e.* quand leur nombre augmente). Plusieurs méthodes ont été utilisées dans la littérature pour la mesure de EA. Cette grandeur peut être déterminée à partir de la mesure de la distribution des tailles des gouttes (microscopie, Compteur Coulter, granulométrie laser, etc.) (Walstra, 1968). Toutefois, Pearce et Kinsella (1978) ont proposé une définition plus simple de EA à partir de la mesure de la turbidité de l'émulsion à 500 nm. Le principe de cette méthode consiste à considérer que la connaissance de l'aire interfaciale suffit pour estimer EA, et donc qu'une connaissance détaillée de la distribution des tailles de gouttes n'est pas nécessaire. De même, la stabilité de l'émulsion peut être reliée à la stabilité de l'aire interfaciale au cours du temps. En effet, la théorie de Mie de la diffusion de lumière par des particules sphériques dispersées indique qu'il y a une relation simple entre la turbidité et l'aire interfaciale. La mesure de turbidité immédiatement après la préparation donne alors accès à l'activité émulsifiante et son évolution au cours du temps permet d'estimer la stabilité de l'émulsion. D'autres méthodes définissant l'activité émulsifiante ont également été

proposées, par exemple la mesure de la différence entre les conductivités de la solution protéique et de l'émulsion (Kato et al, 1985).

3 – Stabilité d'une émulsion (ES)

La stabilité d'une émulsion est une grandeur cinétique définie en pratique par un temps. Ce temps correspond en général à la séparation d'une certaine quantité d'huile de l'émulsion à une température donnée (Pearce et Kinsella, 1978). En termes de fraction volumique, les émulsions H/E présentent une stabilité maximale pour des valeurs de ϕ comprises entre 0,77 et 0,88. A des valeurs de ϕ plus faibles, c'est le drainage ou le crémage gravitaire qui se manifeste, tandis que la coalescence domine pour des valeurs de ϕ plus élevées. Notons que le suivi de la déstabilisation des émulsions par coalescence et crémage a fait l'objet des travaux de Petrucci et Anon (1994) ; McClements (1995) a proposé de suivre la cinétique de crémage au moyen d'un faisceau d'ultrasons ; Dagorn-Scaviner et al (1987) ont utilisé une méthode fondée sur la diffusion de la lumière et Blonk et Vanaalst (1993) ont utilisé la microscopie confocale pour quantifier la formation des couches d'huile à la surface d'une émulsion comme indicateur de stabilité. De même, Xu et Diosady (1994) ont proposé de mesurer la stabilité d'une émulsion lors d'un chauffage et d'une centrifugation ; dans ce cas, la stabilité est exprimée par un rapport de volume :

$$\frac{\text{volume de l'émulsion finale}}{\text{volume de l'émulsion initiale}} \times 100 \quad (\text{I-4})$$

Kato et al (1985) ont considéré que la valeur de la stabilité des émulsions peut être mesurée par une méthode dynamique qui consiste à suivre l'évolution de la conductivité électrique de l'émulsion en fonction du temps, la stabilité de l'émulsion étant alors donnée par la relation :

$$ES = \frac{Cs - Ce}{\Delta t / \Delta C} \quad (\text{I-5})$$

où Cs est la conductivité de la solution protéique, Ce la conductivité minimale de l'émulsion et $\Delta t / \Delta C$ l'inverse de la pente initiale de la courbe de conductivité en fonction de temps. De même, par la méthode de turbidité, la stabilité d'une émulsion a été estimée par Pearce et Kinsella (1978) en comparant la turbidité initiale des émulsions à celle mesurée 10 min après leur préparation. Parmi les méthodes citées précédemment, la méthode de turbidité a été retenue dans notre travail pour chiffrer l'activité et la stabilité émulsifiante. Il s'agit en effet d'une méthode simple qui nécessite uniquement un suivi par un spectrophotomètre UV-visible.

1.3.3.3 Facteurs influençant l'émulsification

De nombreux facteurs influencent les propriétés des émulsions : on peut distinguer les facteurs technologiques (type et géométrie de l'équipement...), les conditions opératoires (intensité de l'apport d'énergie, vitesse d'addition d'huile, température...) et les facteurs liés à la formulation (fraction volumique d'huile, nature et point de fusion de la matière grasse, pH, force ionique, présence de sucres ou de surfactants de faibles masses moléculaires, concentration en protéines solubles et propriétés émulsifiantes des protéines) (Cheftel et al, 1985). La capacité d'une protéine à former une émulsion stable variera donc à la fois en fonction de ses interactions avec les autres ingrédients, des variables environnementales et des équipements mis en jeu.

Une corrélation a été mise en évidence entre d'une part la solubilité de la protéine et d'autre part sa capacité et sa stabilité émulsifiantes. Dans les émulsions de viande de type chair à saucisse (pH 4 à 8), la présence de chlorure de sodium (0,5 à 1 M) est connue pour accroître la capacité émulsifiante des protéines, probablement parce que les protéines myofibrillaires se solubilisent mieux en présence de sel à des concentrations inférieures à 1 M par un effet de « salting-in ». Cependant, l'augmentation de la concentration de sel au-delà de 1 M a un effet négatif sur la solubilité des protéines par effet de « salting-out » (Cheftel et al, 1985). De même, à un pH proche du point isoélectrique, les protéines sont moins solubles et leur capacité émulsifiante diminue en général, bien qu'il existe quelques contre-exemples comme la gélatine et les protéines de blanc d'œuf qui ont des propriétés émulsifiantes optimales à leur pI.

Il est également connu que les propriétés de surface des protéines affectent les propriétés émulsifiantes. Les protéines abaissent la tension de surface (σ_L) qui représente le travail thermodynamique nécessaire pour augmenter d'une unité l'aire interfaciale. Toutefois, l'activité émulsifiante dépend non seulement de la valeur finale de la tension interfaciale, mais aussi de la cinétique d'adsorption des protéines, de leur dynamique de migration vers les interfaces et de leur cinétique de réarrangement aux interfaces qui est fonction de la taille et la flexibilité de la molécule. La tension interfaciale seule ne garantit donc pas nécessairement de bonnes propriétés émulsifiantes. Un autre facteur essentiel est l'hydrophobicité de surface des protéines. Selon certains auteurs, plus la protéine est hydrophobe, plus la concentration protéique aux interfaces E/H sera élevée, plus la tension interfaciale sera faible et plus l'émulsion sera stable. Toutefois, l'hydrophobicité globale (exprimée par le rapport massique entre résidus d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes) ne se corrèle pas bien avec les propriétés émulsifiantes. Kato et Nakai (1980) ont donc suggéré que seuls les groupes

hydrophobes accessibles (i.e. de « surface ») jouent un rôle et que la grandeur clé est l'hydrophobicité de surface d'une protéine, plutôt que l'hydrophobicité globale. Ces auteurs ont établi des méthodes capables de mesurer l'hydrophobicité de surface, soit par chromatographie sur support hydrophobe, soit par spectrofluorimétrie après marquage des groupes hydrophobes par un réactif engendrant de la fluorescence (acide cis-parinarique ou acide naphthalène-sulfonique). Ils ont démontré que l'hydrophobicité de surface est corrélée de façon significative avec une décroissance de la tension interfaciale et avec une augmentation de l'indice d'activité émulsifiante (figure I.6).

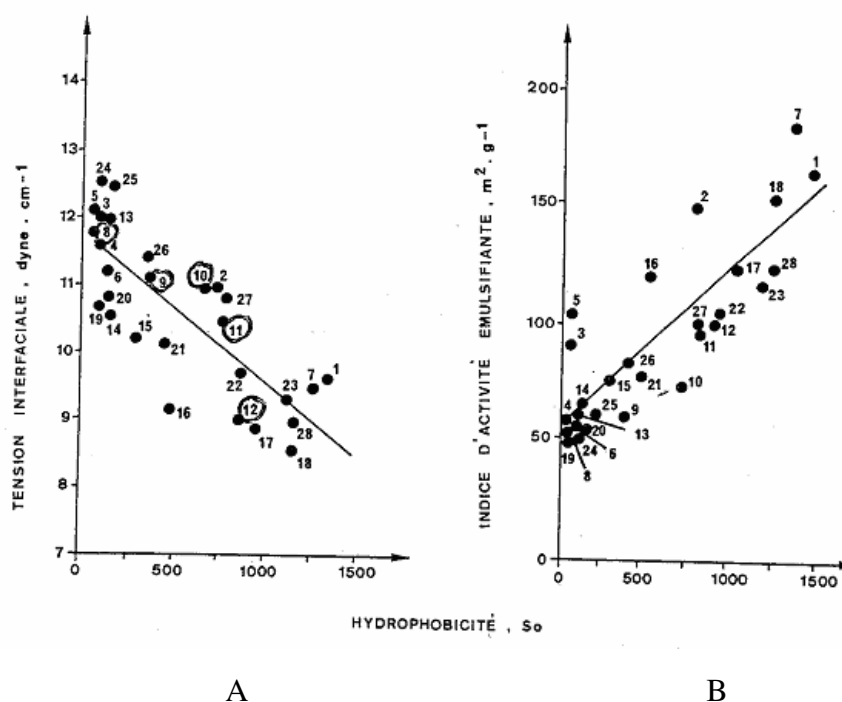


Figure I.6 : Corrélation entre l'hydrophobicité de surface de diverses protéines et la tension interfaciale (A) ou l'indice d'activité émulsifiante de la protéine (B) d'après Kato et Nakai (1980)

Notons encore une fois que les propriétés émulsifiantes des protéines extraites des coproduits animaux ont rarement été étudiées dans la littérature. On peut cependant mentionner les travaux de Acton et al (1970) qui ont traité de l'effet de la concentration en protéines extraites de plusieurs abats (cœur de bœuf, cou de bœuf et cou de porc) sur la stabilité des émulsions. Ces auteurs ont montré d'une part qu'il n'y avait pas de différence significative entre les stabilités des émulsions stabilisées par ces différentes protéines à quantité de protéines constante, et d'autre part que la stabilité augmentait avec la concentration en protéines entre 0,1 et 5 mg/mL et aussi avec la fraction volumique d'huile dans l'émulsion entre 20 et 50%.

I.3.4 Propriétés moussantes

I.3.4.1 Aspects généraux de la formation et de la stabilisation des mousses alimentaires

Une mousse est une dispersion de bulles de gaz dans une phase continue liquide ou semi-solide ; il s'agit donc dans le cas le plus simple d'un système biphasique avec un mélange de deux phases non-miscibles (Dickinson, 1992). Il existe une grande variété de mousses alimentaires de textures très diverses, telles que les mousses de foie, de viande ou de poisson, la meringue et les blancs en neige, ou encore celles issues de l'industrie laitière, comme la crème fouettée et les crèmes glacées, etc. La quantité de gaz incorporé peut varier fortement selon le produit (tableau I.3).

Tableau I.3: Taux de foisonnement de quelques aliments foisonnés parmi les plus courants. (Campbell et Mougeot, 1999).

Produit foisonné	Emulsion*	Φ	Produit foisonné	Emulsion*	Φ
Beurre foisonné	(E/H)	0,2-0,3	Crème glacée et sorbets	(H/E)	1,5-2
Biscuiterie (fourrages)	(-)	0,1-0,3	Fromages à tartiner	(H/E)	0,05-0,2
Blancs en neige	(-)	5-6	Meringue	(-)	7,5-8
Charcuterie (mousses ...)	(H/E)	0,3-0,4	Mousse de fruits	(H/E)	0,3-0,4
Confiserie (marshmallow ...)	(-)	2-3	Mousses de légumes	(H/E)	0,3-0,4
Crème chantilly et toppings	(H/E)	0,7-2	Pâtisserie (génoise ...)	(H/E)	0,3-0,5

* précise si la phase continue est une émulsion H/E, E/H ou n'est pas une émulsion (-).

De même, la taille des bulles varie fortement selon les produits (de quelques micromètres au millimètre) et dépend de nombreux facteurs, tels que la tension superficielle et la viscosité de la phase continue, l'apport d'énergie lors de la formation de la mousse, etc. La stabilisation des interfaces eau-air nécessite la présence d'un agent de surface qui est toujours une protéine dans le cas des mousses alimentaires. Les protéines adsorbées abaissent non seulement la tension de surface, mais forment également une membrane protectrice qui peut présenter un comportement viscoélastique.

I.3.4.2 Méthodes de détermination des propriétés moussantes des protéines

Les propriétés moussantes des protéines sont en général mesurées par l'augmentation du volume initial de liquide due à l'incorporation de l'air lors de la formation de la mousse (capacité ou pouvoir moussant), puis par l'effondrement de la mousse au cours du temps

(stabilité moussante) (Raymundo et al, 1998). Plusieurs méthodes ont été décrites, les différences se situant essentiellement au niveau du mode de formation de la mousse (battage ou bullage) et du type de mesure : volumétrique ou gravimétrique (Halling, 1981). Par exemple, le pouvoir moussant (FA%) peut être défini à partir du volume de la mousse :

$$FA\% = 100 \cdot (V_m - V_L) / V_L \quad (I-6)$$

Dans cette relation, V_m et V_L sont respectivement le volume de la mousse et le volume initial du liquide. On peut définir également le taux de foisonnement à partir de la masse volumique de la mousse :

$$\Phi = 100 \cdot (\rho_L - \rho_m) / \rho_m \quad (I-7)$$

Où : ρ_L et ρ_m sont les masses volumiques du liquide et de la mousse respectivement. Certains auteurs préfèrent toutefois utiliser la fraction volumique du gaz ε_G qui a l'avantage de présenter une échelle fermée de 0 à 100% et qui s'obtient par une mesure gravimétrique :

$$\varepsilon_G = 100 \cdot (\rho_L - \rho_m) / \rho_L \quad (I-8)$$

On notera que toutefois que ces deux grandeurs sont reliées par l'expression suivante :

$$\varepsilon_G = \frac{\Phi}{1 + \Phi} \quad (I-9)$$

De même, certains auteurs définissent le pouvoir moussant par $100 \cdot (V_m / V_L)$, ce qui se déduit aisément du taux de foisonnement par $\Phi + 100$. Dans notre travail, nous utiliserons les équations I-6 pour chiffrer la capacité moussante.

La stabilité d'une mousse, comme celle d'une émulsion, peut être quantifiée par un temps : il s'agit en général du temps nécessaire pour atteindre une réduction de 50% du volume maximal de la mousse. Cette méthode a été retenue pour la détermination de la stabilité des mousses protéiques formées en discontinu. En continu, nous avons préféré effectuer un suivi de l'effondrement de la mousse formée en fonction du temps. Globalement, les trois principaux mécanismes de déstabilisation des mousses sont :

- le *disproportionnement* qui est un mûrissement dû à la solubilité du gaz (Dickinson, 1992) ; celui-ci joue un rôle important dans le cas du CO_2 , alors qu'il est réduit pour l'azote par rapport à l'air ;
- le *crémage* des bulles et le *drainage par gravité* du liquide dans le cas des mousses humides ; si l'on admet que les bulles suivent la loi de Stokes (Pozrikidis, 2002), la vitesse terminale ascensionnelle des bulles (équation I-3) est proportionnelle à la différence des

masses volumiques des phases, au carré du diamètre des bulles et à l'inverse de la viscosité de la phase continue.

- la *coalescence* irréversible des bulles qui fait suite au crémage des bulles ou au drainage du liquide (Sagis et al, 2001).

1.3.4.3 Facteurs influençant la formation et la stabilité d'une mousse

De nombreux facteurs, tels que la solubilité des protéines, le pH, la force ionique, la durée du battage, la température, etc. influencent à la fois la formation et la stabilité d'une mousse. Bien que de nombreuses études aient souligné l'importance de la solubilité des protéines sur leur pouvoir moussant et sur la stabilité des mousses protéiques, il semble également que les composés insolubles puissent jouer un rôle bénéfique sur la stabilisation des mousses, probablement par leur effet sur la viscosité de surface (Cheftel et al, 1985). Le pH joue également un rôle clé sur la formation et la stabilité d'une mousse. En général, la formation d'une mousse est difficile au pI, même si la stabilité de la mousse devrait y être optimale. Thakur et al (2003) ont étudié l'effet du pH sur la production en continu d'une mousse pour une formulation modèle (de type viande) stabilisée par des caséinates de sodium (pI 4,6). Leurs résultats montrent que le pH de la formulation a une influence sur le diamètre moyen des bulles. A pH 4,6, ces diamètres sont plus élevés, mais la mousse présente une meilleure stabilité. Ragab et al (2004) ont également montré que le chlorure de sodium favorise en général la formation des mousses préparées à base de protéines, mais réduit leur stabilité.

Selon Halling (1981), la concentration en protéines joue également sur la formation et la stabilité des mousses : leur domaine d'utilisation est en général compris entre 2-8% (p/v) de protéines. Au-delà (10%), la stabilité de la mousse s'accroît encore, parfois au détriment de son volume. Un autre facteur qui joue un rôle essentiel sur la formation des mousses est l'intensité du battage : si une vitesse d'agitation élevée favorise en général la formation de la mousse, une agitation trop intense peut favoriser la re-coalescence des bulles. Ainsi, Thakur et al (2003) ont montré que le diamètre des bulles ne diminuait qu'assez faiblement lors d'une augmentation de la vitesse d'agitation de 200 à 1000 tpm.

Un dernier facteur qui influence fortement la formation et la stabilisation des mousses est l'activité de surface des protéines. En effet, il est clair qu'un liquide pur ne mousse pas. Les protéines ont toutes, plus ou moins, la capacité d'abaisser la tension de surface. Toutefois, le pouvoir moussant, comme le pouvoir émulsifiant, dépend certes de la valeur à l'équilibre de la tension de surface, mais aussi et surtout des cinétiques d'adsorption et de réarrangement

des protéines à l'interface. Cuvelier et Michon (2003) ont ainsi montré que les protéines qui migrent rapidement aux interfaces présentent un pouvoir moussant très important, indépendamment de la tension de surface, la vitesse de migration des protéines dépendant principalement de la taille de ces macromolécules et de leur flexibilité, ainsi que de leur hydrophobicité de surface. Par exemple, la caséine qui est une protéine de petite taille (19-23 kDa) et qui présente très peu de structure tertiaire (elle ne possède pas de pont disulfure intramoléculaire) migre plus facilement aux interfaces que les protéines globulaires. En revanche, elle est, pour les mêmes raisons, moins apte à stabiliser les mousses à long terme.

Dans la littérature, on trouve également peu de travaux sur l'activité de surface des protéines extraites des coproduits animaux, la majorité de ceux-ci portant sur la comparaison des propriétés de surface des extraits protéiques de muscles (O'Neill et al, 1989a et b ; Mohan et al, 2008). On peut cependant citer les travaux de Acton et al (1970) sur la comparaison de la tension de surface de plusieurs protéines extraites de cœurs de bœuf, de cou de bœuf et de cou de porc. Comme attendu, leurs résultats montrent que la tension de surface diminue avec la concentration en protéines pour tous les types de protéines étudiées.

I.4 Ingrédients protéiques commerciaux

Les ingrédients protéiques commerciaux les plus fréquemment utilisés dans les produits élaborés de la filière viande sont les protéines de lait (sous forme de caséinates ou de protéines de lactosérum), les protéines de plasma et les protéines d'origine végétale (isolat de soja en particulier). Nous avons ajouté à cette sélection les protéines de blanc d'œuf, très employées dans le domaine de la pâtisserie-viennoiserie. Les propriétés fonctionnelles de ces ingrédients protéiques seront comparées avec celles des protéines extraites et concentrées des coproduits. Le tableau I.4 résume les principales propriétés fonctionnelles de ces ingrédients commerciaux, ainsi que les principales applications dans lesquelles ils sont utilisés. Nous donnerons par la suite un aperçu plus détaillé sur ces ingrédients, incluant compositions, utilisations et détail des propriétés fonctionnelles.

I.4.1 Caséines

Les caséines sont une famille de protéines de masse moléculaire assez faible, entre 20 et 25 kDa, ce qui contribue à leur remarquable stabilité (Yada, 2004). Elles sont essentiellement présentes dans le lait sous forme de micelles. Elles sont donc facilement isolables par ultracentrifugation ou par précipitation isoélectrique à pH 4,6.

La fraction protéique non-sédimentable du lait, *i.e.* qui reste en solution après la précipitation des caséines à pH 4,6, correspond aux protéines sériques. Les caséines ont une hydrophobicité de surface élevée due à leurs structures ouvertes. Les études expérimentales indiquent que les caséines ont des structures secondaires et tertiaires faibles, ce qui les rend stables et difficiles à dénaturer par action de la chaleur et contribue à leur activité de surface élevée. Cette dernière propriété leur confère également de bonnes propriétés moussantes et émulsifiantes. Selon Hill (1986), la capacité émulsifiante des caséines (336 g huile/g caséines) est la meilleure parmi les ingrédients commerciaux, ce qui explique leur grande utilisation comme agent de surface, surtout dans les émulsions laitières (Vega et al, 2005 ; Davis et al, 2004). En général, les caséines sont commercialisées sous la forme de caséinates, de sodium ou de calcium.

Tableau I.4 : Principales propriétés techno-fonctionnelles des protéines commerciales.

Type de protéines	Fonctionnalité	Application
Protéines du muscle, de l'œuf, de lait et de soja	Rétention d'eau	Produits à base de viande, produits de la mer, viennoiseries, yaourt
Protéines du muscle, de plasma, de l'œuf et de lait	Gélification	Produits à base de viande, produits laitiers, desserts à base de gélatine
Protéines de muscle, du lactosérum, de l'œuf, de soja, gluten	Adhésion-cohésion	Produits à base de viande, pâtés, produits de boulangerie
Protéines de muscle, de lait, de l'œuf et de soja	Émulsification	Sauces, sauces salades, produits de boulangerie et pâtisserie
Protéines de l'œuf, de lait, de soja	Foisonnement	Pâtisserie, desserts gelés

I.4.2 Protéines de lactosérum

Les protéines sériques du lait ou protéines de lactosérum sont obtenues par le séchage et/ou par la concentration du lactosérum, de façon à éliminer l'eau, les minéraux et le lactose (I.3.1.1). Le lactosérum peut être séché directement sous la forme de poudre ; lorsque la poudre contient au moins 25% de protéines, le produit est appelé « concentré de lactosérum. » Les concentrés de lactosérum les plus communs sont commercialisés à 35%, 55% et 80% de protéines. Lorsque ces protéines subissent un traitement de purification poussé, on peut

obtenir des produits contenant plus de 90% protéines dans la matière sèche ; il s'agit alors d'isolats de lactosérum (Yada, 2004).

Les protéines sériques ont une solubilité élevée dans un domaine de pH assez large, ce qui rend leur utilisation assez fréquente dans les boissons, mêmes lorsqu'elles sont acides. A une concentration supérieure à 5%, les protéines sériques manifestent de bonnes propriétés gélifiantes quand elles sont chauffées au delà de 70-85°C. Les protéines sériques sont également utilisées dans la production de yaourts, de crèmes glacées et comme blanchisseurs de café (Euston et Hirst, 2000). Elles sont aussi connues pour leur importante capacité moussante (Davis, 2004), mais elles ne sont pas utilisées comme émulsifiant.

I.4.3 Protéines de soja

Le soja est une légumineuse dont les graines sont consommées en Extrême-Orient depuis près de deux millénaires. La farine de graine de soja est très riche en protéines (40%), avec une valeur nutritionnelle comparable à celle des protéines animales, comme le lait et la viande de bœuf. Les protéines de soja peuvent être extraites par solubilisation en milieu alcalin, puis purifiées par précipitation au pI (4,5). Elles sont abondamment utilisées dans les préparations alimentaires parce qu'elles possèdent de bonnes propriétés fonctionnelles, telles qu'une bonne capacité de rétention d'eau, ainsi que de très bons pouvoirs émulsifiant, moussant et gélifiant. Dans la filière viande, une utilisation bien connue des protéines de soja est le steak haché industriel.

I.4.4 Protéines du blanc d'œuf

Le blanc d'œuf ou albumen est largement utilisé en charcuterie, pâtisserie et confiserie. Il est souvent considéré comme le meilleur agent gélifiant ou liant. L'efficacité du blanc d'œuf comme agent moussant résulte d'une synergie réussie entre les différentes protéines et glycoprotéines constitutives de l'albumen. Ainsi, chaque protéine de l'albumen a un rôle différent. Par exemple, on peut produire une meringue acceptable avec seulement le composant majeur du blanc d'œuf, l'ovalbumine, bien que la texture obtenue soit plus grossière que celle de la meringue de blanc d'œuf entier et bien qu'il faille un battage plus long (Dickinson, 1996). L'utilisation du blanc d'œuf comme agent moussant résulte principalement de la stabilité exceptionnelle des mousses de blanc d'œuf ; celle-ci est à l'origine d'un très grand nombre de produits foisonnés (blancs en neige, génoise, meringue...).

I.4.5 Protéines de plasma sanguin

Le plasma représente 60% du sang ; il est collecté après la centrifugation de celui-ci (voir paragraphe I.3.2.2). Les protéines du plasma ont de bonnes propriétés gélifiantes et sont utilisées en particulier pour cette raison dans les préparations de charcuterie (tableau I.5). Le traitement thermique progressif du plasma jusqu'à 50-60°C en présence d'ions Ca^{2+} conduit à la formation d'un gel translucide fragile. A des températures plus élevées, le gel devient ferme et thermoplastique. Les propriétés liantes des protéines de plasma en font également un ingrédient largement utilisé dans les préparations charcutières (Delaitre, 1984).

I.5 Interactions entre les protéines et les autres hydrocolloïdes

Dans cette section, nous nous intéresserons aux possibles modifications des propriétés fonctionnelles des protéines résultant de la présence d'autres hydrocolloïdes, en particulier les polysaccharides, lors des opérations d'émulsification et de foisonnement. En fait, les systèmes alimentaires consistent toujours en un mélange complexe de plusieurs ingrédients, parmi lesquels on trouve en plus des protéines et de l'eau, des polysaccharides, de la matière grasse, et des composés de faibles poids moléculaires (sucres, minéraux...). Parmi ces constituants, les protéines et les polysaccharides sont ceux qui jouent le rôle le plus important sur la texture et la stabilité des émulsions et des mousses alimentaires, mais ce sont aussi ceux qui sont le plus susceptibles d'interagir et de présenter des comportements non idéaux en mélange. Schématiquement, les protéines devraient faciliter la formation de l'émulsion ou de la mousse, et les polysaccharides amélioreraient sa stabilité simplement en augmentant la viscosité de la phase continue. Ce schéma simpliste ne tient pas compte du fait que les polysaccharides et les protéines présentent des interactions particulières résultant du fait qu'il s'agit de deux familles de biopolymères présentant des structures très différentes.

I.5.1 Généralités sur les hydrocolloïdes

Les hydrocolloïdes utilisés dans les aliments sont des agents stabilisants. Ils peuvent être des agents épaississants et/ou gélifiants. En effet, ce sont tout d'abord de puissants modificateurs de texture, même lorsqu'ils sont présents en faible quantité ; de plus, ils permettent d'augmenter fortement la stabilité dans le temps des aliments élaborés (Syrbe et al, 1998 ; Thaiudom et al, 2003) ; enfin, ce sont également des ingrédients de substitution de la matière grasse, comme par exemple dans le cas des saucisses allégées (Foxj et al, 1983 ; Mittal et Barbut, 1994 ; Xlong et al, 1999 ; Luruena-Martinez, 2004). Il existe une très

grande variété d'hydrocolloïdes utilisables dans les aliments (xanthane, guar, alginates, amidon, farine de graine de caroube, carraghénanes, dérivés de la cellulose, gomme arabique, pectine, ...) ; il s'agit de polymères formés de sucres comme monomères, à l'exception de la gélatine qui est une protéine et qui reste l'hydrocolloïde le plus universellement utilisé dans l'industrie agroalimentaire à ce jour. L'effet réel des hydrocolloïdes sur la texture des aliments dépend fortement :

- de la concentration à laquelle ils sont employés ;
- des interactions éventuelles entre eux lorsqu'ils sont utilisés en mélange ;
- des interactions avec les autres ingrédients (principalement les protéines).

Les propriétés des hydrocolloïdes sont essentiellement liées aux interactions privilégiées que ces macromolécules établissent avec l'eau, interactions que dépendent de leur conformation et leur volume hydrodynamique en solution. Ce sont majoritairement des polyélectrolytes anioniques (à cause des groupes -COO^- et -OSO_3^- , voire -OPO_3^{2-}) ou neutres (dextranes, maltodextrines, méthylcellulose...), même si certains sont cationiques (chitosan, certains guar...). D'un point de vue rhéologique, les solutions de polysaccharides présentent souvent une élasticité élevée ainsi qu'un plateau newtonien de viscosité en écoulement à faible déformation, mais elles sont fortement rhéofluidifiantes à déformation plus élevée, c'est-à-dire que leur viscosité diminue sous l'effet de l'agitation (Katzbauer, 1998). L'impact des polysaccharides sur la viscosité dépend fortement de la capacité des macromolécules à s'exclure mutuellement d'un volume de la solution et il est donc fonction de la longueur de chaîne et de la conformation des macromolécules en solution.

I.5.2 Description des principaux types d'interactions entre protéines et polysaccharides

Lorsque les protéines et les polysaccharides sont mis en solution, ils interagissent de façon différente selon le pH et la force ionique du milieu, mais aussi selon les composés de faibles poids moléculaires présents. Il en résulte une très grande variété de propriétés de texture, de gélification, de solubilité, ainsi que de comportements possibles aux interfaces en fonction de la formulation. En fait, les propriétés fonctionnelles des mélanges de biopolymères sont souvent très différentes des propriétés des solutions des polymères purs (Dickinson, 1993 ; Samant et al, 1993 ; Ledward, 1994 ; Tolstoguzov, 1997). D'un point de vue thermodynamique, les protéines et les polysaccharides peuvent être compatibles ou incompatibles en solution (Ledward, 1994 ; Samant et al, 1993). Lorsqu'ils sont thermodynamiquement incompatibles, le système peut évoluer vers une ségrégation, voire une séparation des phases. Un système biphasique peut alors être obtenu dans lequel les

différentes molécules se retrouvent chacune dans des phases séparées ; on parle alors de séparation « ségrégative ». Lorsqu'ils sont thermodynamiquement compatibles, deux types de solutions peuvent être obtenus :

- (1) un système homogène et stable dans lequel les molécules sont co-solubles ;
- (2) un système biphasé dans lequel les deux molécules interagissent de façon attractive et se retrouvent essentiellement dans la même phase concentrée, d'où le nom de séparation de phases « associative ». Dans ce dernier système, une complexation ou coacervation complexe a lieu, en général en raison d'une attraction électrostatique entre les biopolymères (figure I.7).

La complexation entre les polysaccharides et les protéines végétales trouve des d'applications alimentaires, par exemple la substitution de la viande (Soucie et Chen, 1985). Ainsi, Tolstoguzov et al (1974) ont démontré que des complexes entre protéines de soja ou caséines et alginates ou pectines produisent des textures qui ressemblent à celle de la viande hachée. De même, les complexes de protéines de blanc d'œuf ou de protéines de soja et de xanthane peuvent être utilisés dans les formulations de viandes maigres en lipides (Chen et Soucie, 1986). Nous limiterons volontairement notre étude des interactions protéines-polysaccharides au cas du xanthane parce qu'il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire, notamment celle de la viande, et que c'est le polysaccharide qui sera le plus utilisé dans ce travail.

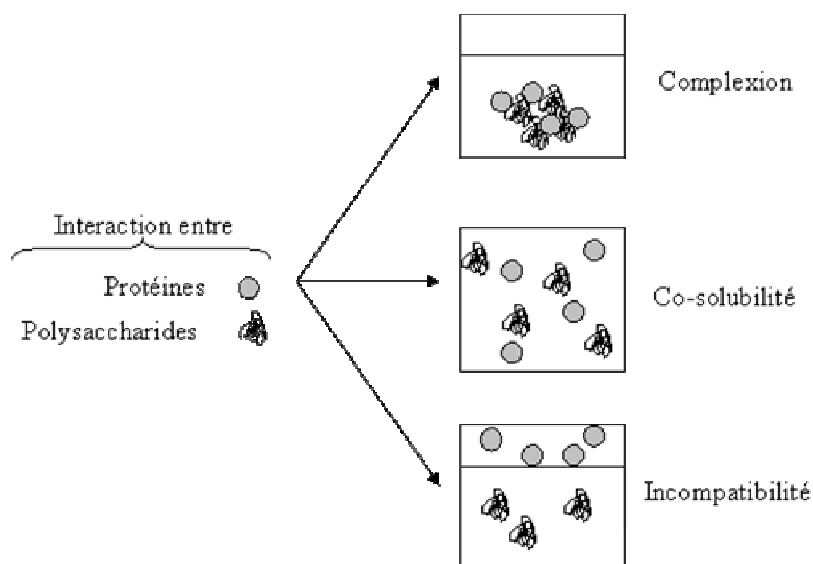


Figure I.7 : Illustration des principales interactions possibles entre les protéines et les polysaccharides (Kruif et al, 2001).

I.5.3 Le xanthane

Le xanthane est un polysaccharide obtenu à l'échelle industrielle par fermentation de sucres grâce à la bactérie *Xanthomonas campestris*. Le poids moléculaire du xanthane est très

élevé (entre 10^3 et 10^4 kDa). La chaîne principale est formée de résidus de D-glucose sur lesquelles sont branchées des chaînes latérales. On trouve une chaîne latérale pour deux molécules de glucose ; la chaîne latérale est constituée de trois sucres : un α -D mannose, un acide β -D glucuronique et un α -D mannose terminal (figure I.8). La présence d'acide glucuronique et d'acide pyruvique confère au xanthane un caractère anionique marqué (charges négatives jusqu'à pH 1). Dans les milieux alimentaires, ces fonctions acides sont neutralisées par les cations Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} .

La conformation moléculaire du xanthane cristallin consiste en une hélice. En solution aqueuse et sous une force ionique élevée, le xanthane adopte une conformation hélicoïdale ordonnée, semblable à celle observée dans l'état cristallin (Morris, 1977 ; Sato et al, 1984a et 1984b). En effet, la structure en hélice du xanthane est stabilisée par quatre liaisons hydrogène intramoléculaires. L'alignement des chaînes latérales confère une grande rigidité à la macromolécule et stabilise la structure hélicoïdale du xanthane dans une large gamme de pH et de température (Pettitt, 1980 ; Young et al, 1994 ; Morris, 1995 ; Kelco.Ko ; 1996). Par exemple, la viscosité du xanthane reste bien moins sensible à la chaleur que celle des autres polysaccharides, rendant la molécule stable thermiquement (figure I.9). Cela explique sa grande utilisation dans la préparation des produits élaborés de la viande (Durand, 2005). La charge négative du xanthane dans la gamme habituelle de pH facilite les interactions électrostatiques avec les protéines. Cependant, l'incompatibilité thermodynamique entre xanthane et protéines demeure la règle à cause de la rigidité des chaînes de xanthane (Syrbe et al, 1998). Il est par exemple connu que les interactions entre les caséines et le xanthane tendent vers la séparation de phase.

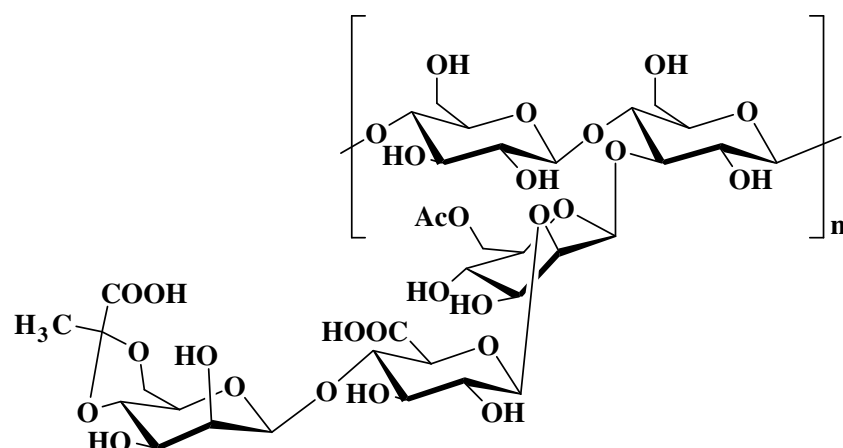


Figure I.8 : Structure de l'unité de répétition du xanthane produit par *Xanthomonas campestris*

Le xanthane est également un épaississant soluble à froid en raison de son degré de branchement élevé et des charges répulsives des groupements acides. C'est un épaississant qui ne peut former que des gels physiques très faibles ; ceux-ci sont irréversiblement détruits sous l'effet d'une agitation mécanique (Schorsch et al, 1997). Chattong et al (2007) ont montré que l'addition de xanthane à 1% dans la saucisse Thaï (saucisse traditionnelle de Thaïlande fabriquée à partir de viande d'autruche) diminue la rigidité du produit, ce qui se traduit par une diminution de son module élastique.

Il faut aussi mentionner que le xanthane est le seul polysaccharide alimentaire qui présente un seuil d'écoulement. Au-delà de ce seuil, les solutions de xanthane présentent un comportement fortement rhéofluidifiant. Il est aussi très stable en milieu acide et ne précipite pas en présence de concentrations élevées en sel (comme une saumure à 250 g/L). Fox et al (1983) ont montré que, contrairement au guar, à la gomme arabique et à la caroube, l'addition de xanthane dans les mêlées de saucisse de Francfort stabilise la texture du produit et évite sa détérioration par l'acidité lors de sa marinade au vinaigre à 37°C, même après un stockage de longue durée.

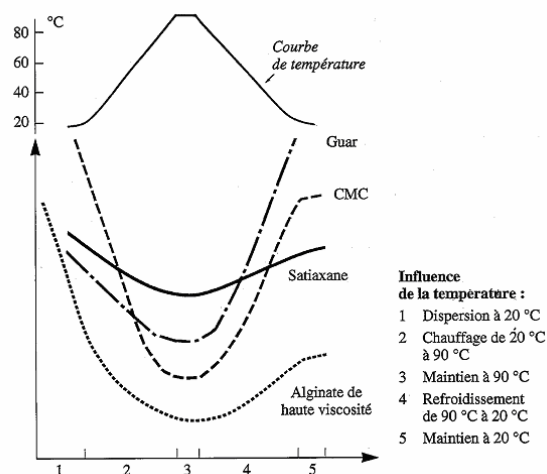


Figure I.9 : Comportement de divers hydrocolloïdes au cours d'un cycle de chauffage-refroidissement (doc. CECA). L'axe abscisses représente les variations de température auxquelles sont soumis les hydrocolloïdes ; celui des ordonnées représente la viscosité mesurée au moyen d'un viscosigraphe Brabender.

On retiendra enfin que les interactions entre le xanthane et les protéines de viande ont rarement fait l'objet de recherches dans la littérature, contrairement aux protéines de lait. Il faut cependant mentionner les travaux de Barbut et Mittal (1992) sur l'effet d'addition de xanthane dans les saucisses : ces auteurs ont démontré que l'addition de 0,5% de xanthane aux saucisses de porc améliore les rétentions d'eau et d'huile, tout en donnant une texture plus moelleuse au produit. En revanche, les autres études disponibles sont toutes focalisées sur la complexation du xanthane et des protéines de la viande ou sur son utilisation comme ingrédient de substitution aux lipides dans les préparations de charcuterie allégées. Par exemple, Mittal et Barbut (1994) ont montré que la texture de la saucisse maigre de Francfort était meilleure lorsque la matière grasse était remplacée par du xanthane plutôt que par des carraghénanes, même après cuisson et stockage à froid.

I.6 Émulsification et foisonnement : procédés et équipements

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, quantifier les propriétés fonctionnelles d'un ingrédient protéique seul en solution présente un intérêt lorsque ces propriétés sont conservées en présence d'autres ingrédients, mais aussi lorsque ces propriétés ne sont pas modifiées par les choix technologiques et les conditions de procédés (contrainte de cisaillement, temps de mélange, mode de production continu ou discontinu, etc.). Pour les ingrédients, nous avons choisi de tester les effets des polysaccharides, comme le xanthane, et de la présence de matières grasses (huile de tournesol); pour les opérations unitaires, nous avons en

conséquence retenu comme test les opérations d'émulsification et de foisonnement, à la fois en modes discontinu et continu, qui mettent justement en présence les protéines aux côtés de polysaccharides et de matières grasses. En fait, nous avons aussi choisi d'étudier ces deux opérations parce que l'émulsification est sans aucun doute l'un des procédés les plus répandus dans l'industrie alimentaire, notamment en charcuterie, par exemple pour la fabrication de « pâtes fines ». Quant au foisonnement, il a connu une forte croissance depuis les années 90 avec le développement de « mousses » dans le domaine de la charcuterie, mais aussi des mousses laitières, de légumes et de poisson. L'opération de foisonnement présente de plus un intérêt économique important puisqu'elle permet l'introduction de produits nouveaux qui stimulent la croissance du marché par le renouvellement régulier de l'offre grâce à leur apparence homogène, leur texture fine et le fait qu'ils sont considérés par le consommateur comme « allégés ». Cette opération constitue donc un débouché prometteur pour les ingrédients des industries alimentaires.

Dans cette partie, nous nous intéressons donc tout d'abord aux aspects technologiques des procédés d'émulsification et de foisonnement et aux modes de mise œuvre de ces opérations. Nous détaillerons ensuite sur les procédés discontinus et continus en donnant des exemples pour chaque opération.

I.6.1 Aspects technologiques de l'émulsification et du foisonnement

Malgré la similitude entre les deux opérations, puisqu'il s'agit dans les deux cas d'opérations de mélange dispersif, les équipements utilisés pour le foisonnement sont moins nombreux et plus spécifiques que ceux utilisés pour l'émulsification. Cela provient essentiellement des différences plus importantes entre les propriétés physiques des phases mises en présence dans le cas du foisonnement. Ainsi, pour le foisonnement, on retiendra que :

- Le rapport des viscosités des phases gaz et liquide η_G/η_L est toujours très inférieur à 1, contrairement à l'émulsification où ce rapport peut varier dans de très larges proportions ;
- Le rapport des masses volumiques des phases gaz et liquide ρ_G/ρ_L est très inférieur à 1 aux pressions utilisées pour la dispersion de gaz dans des milieux alimentaires (1-5 bars), contrairement aux systèmes eau-huile ;
- la tension de surface est bien supérieure aux tensions interfaciales entre deux liquides.

Cela induit à une résistance plus élevée à la rupture de l'interface gaz-liquide, des diamètres moyens de bulles bien plus grands que ceux des gouttes et une plus grande propension à la

séparation de phase par gravité (crémage, drainage) si les procédés et les conditions opératoires sont similaires.

En général, ces deux opérations nécessitent une grande quantité d'énergie car la dispersion de liquide sous forme de gouttes ou d'une phase gaz sous forme de bulles se traduit par une importante création d'interfaces. En pratique, l'énergie fournie doit être bien supérieure au travail thermodynamique requis, estimé à partir des forces de surface (équation I-2) : par exemple, pour l'émulsification, elle doit être au moins 1000 fois plus élevée que l'énergie de surface (Walstra, 1993), non seulement parce que toute l'énergie fournie ne contribue pas à la dispersion, mais aussi parce qu'il faut tenir compte de la recalescence possible des objets en cours d'opération. L'énergie nécessaire à ces opérations peut être apportée au système de différentes façons, ce qui entraîne l'existence de nombreuses technologies : elle peut être d'origine mécanique (cas le plus fréquent), mais aussi sonique dans le cas de l'émulsification.

Il est également possible de classer les procédés d'émulsification ou de foisonnement selon le processus de mélange mis en jeu. On citera par exemple les systèmes mécaniquement agités qui génèrent un cisaillement élevé ou de la turbulence, soit au moyen de mobiles classiques (turbines pour les faibles viscosités...), soit de mobiles spécifiques (émulsionneur, fouet, pétrisseur...) pour les produits pâteux, mais aussi les dispositifs de type rotor-stator et les moulins colloïdaux. Dans ces systèmes, l'énergie mécanique peut être dissipée soit dans l'ensemble du fluide, soit dans une zone confinée de l'appareil dans laquelle on force les deux liquides ou le mélange gaz-liquide à passer. On citera ensuite les systèmes dans lesquels la dispersion se produit sous l'effet d'un gradient de pression faible (émulsification par membrane) ou modéré (cas des mélangeurs statiques) ; lorsque le gradient de pression devient très élevé, son effet peut être couplé pour l'émulsification à un phénomène de dispersion par cavitation (cas des homogénéisateurs hautes pressions) qui intervient aussi dans les systèmes mettant en jeu l'action d'ultrasons. On peut encore citer la technique du jet d'impact (microfluidisation) dans laquelle on utilise l'énergie cinétique des jets pour l'émulsification. Le tableau I.5 résume ces méthodes, leur domaine d'utilisation, et donne un ordre de grandeur de leur consommation énergétique dans le cas de l'émulsification (McClements, 1999).

Tableau I.5 : Principaux critères de comparaison entre les techniques d'émulsification (McClements, 1999)

Type de l'appareil	Mode opératoire	Consommation énergétique	Diamètre minimum	Domaine de viscosité
Mélangeurs rapides	discontinu	faible	2 μm	faible-moyen
Moulins colloïdaux	continu	intermédiaire	1 μm	moyen-élevée
Homogénéisation haute pression	continu	élevée	0,1 μm	faible-moyen
Émulsification par ultrasons	discontinu	faible	0,1 μm	faible-moyen
Jet d'impact	continu	élevée	1 μm	faible-moyen
Émulsification par membrane	discontinu ou continu	faible	0,3 μm	faible-moyen

Les équipements disponibles pour la production de mousses en discontinu à l'échelle industrielle sont des batteurs planétaires qui peuvent travailler à la pression atmosphérique par aspiration de l'air par le ciel, ou bien sous pression en utilisant de l'air ou un gaz comprimé. L'appareil le plus communément utilisé consiste donc en une simple cuve agitée par un ou plusieurs mélangeurs spécifiques, éventuellement animés d'un mouvement planétaire, qui peuvent également être couplés à des opérations de chauffage et refroidissement. On peut ainsi citer le batteurs planétaire Hobart®, KitchenAid®, Tonelli®... Pour le foisonnement en continu, on peut citer deux types de technologies : les systèmes rotor-stator (Mondomix®, Trefa®, etc.) et les échangeurs à surface raclée qui sont principalement utilisés dans le domaine de la crème glacée.

Dans ce qui suit, nous passerons en revue les différents dispositifs utilisés pour la production d'émulsion ou de mousse. On notera cependant que la description détaillée de ces appareils sort du cadre de notre travail. Pour plus de détails, le lecteur intéressé pourra consulter la thèse de Labbafi (2005).

1.6.1.1 Procédés discontinus

Dans les procédés discontinus, la force motrice de l'émulsification et du foisonnement est presque toujours la puissance fournie par un agitateur : en effet il s'agit quasi-exclusivement de procédés de « battage ». Les caractérisations des émulsions et des mousses obtenues dépendent fortement des paramètres géométriques et opératoires du procédé utilisé, tels que le design et les caractéristiques géométriques du mobile, sa vitesse de rotation et la durée de battage. Il ne faut pas non plus oublier le rôle essentiel de la composition de la phase continue, ainsi que celui des autres variables environnementales, comme la température et la

pression, sur la qualité finale des émulsions et des mousses créées. Ces paramètres doivent être ajustés par expérience.

L'opération d'émulsification, comme celle de foisonnement, peut être conduite dans un récipient de taille variable, à l'atmosphère ou sous pression, ce qui permet par exemple un ajout progressif d'additifs ou d'huile dans le cas de l'émulsification, ou bien une injection du gaz dans le cas du foisonnement. L'avantage des procédés discontinus est qu'ils sont d'une utilisation assez souple puisqu'ils permettent le choix du ou des mobiles d'agitation qui peuvent être une combinaison d'agitateurs standards (turbines...), éventuellement équipés d'un stator pour améliorer la dispersion. Ces équipements sont en général économiques, facile à installer et à entretenir. En revanche, la faiblesse de ces équipements réside dans le manque de maîtrise des conditions opératoires ; bien souvent, le seul paramètre dont l'opérateur dispose pour contrôler l'opération, et donc la qualité des émulsions et des mousses formées, est la durée d'agitation ou de battage. Par exemple, l'opération de foisonnement en discontinu consiste à placer une quantité donnée de phase continue dans une cuve de volume donné, puis à la fouetter à vitesse maximale jusqu'à l'obtention du taux de foisonnement désiré, voire du taux de foisonnement maximal possible si l'agitation est poursuivie assez longtemps ; seul le temps de battage permet donc de contrôler le taux de foisonnement.

Pour l'émulsification, la technologie la plus répandue en mode discontinu dans l'industrie est le mélangeur rapide (figure I.10). Ceux-ci sont souvent multifonctions et peuvent aussi permettre de broyer, affiner, chauffer, refroidir, fondre, pasteuriser, voire stériliser. Ils forment typiquement des émulsions grossières, avec des diamètres de gouttes entre 1 et 10 μm (McClements, 1999) et ils permettent d'obtenir des résultats d'une qualité souvent bien suffisante pour satisfaire aux exigences d'une émulsion commercialisable, notamment pour les mêlées de charcuterie. Pour obtenir des émulsions avec des tailles de gouttes plus petites, par exemple dans le secteur laitier, les émulsions grossières obtenues par les mélangeurs rapides doivent subir d'autres traitements comme par exemple une homogénéisation hautes pressions (figure I.11). Dans ce cas, l'émulsification par des mélangeurs rapides est considérée comme la première étape de la fabrication de l'émulsion (McClements, 1999).

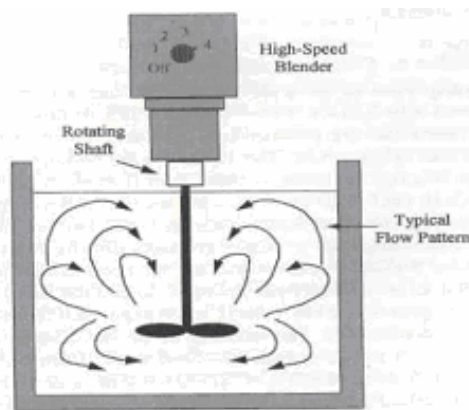


Figure I.10 : Schéma d'un mélangeur rapide pour la production d'une émulsion grossière

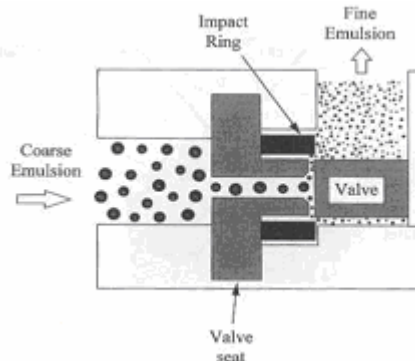


Figure I.11 : Valve d'un homogénéisateur hautes pressions

Pour le procédé discontinu de foisonnement, la technologie la plus simple est le batteur électrique ménager, le fouet électrique ou le robot-mixer qui peuvent mettre en oeuvre des mobiles axiaux, deux mobiles excentrés ou un système animé d'un mouvement planétaire. Une bonne partie des équipements industriels disponibles sur le marché dérivent de ces systèmes et sont également multi-usages : broyeur, malaxeur, mélangeur, pétrisseur et foisonneur (figure I.12). Ces systèmes sont souvent utilisés pour élaborer des produits facilement moussants, tels que le blanc d'œuf battu en neige, la crème fouettée, les pâtes à gâteaux ou pour élaborer les pâtés et les mousses de viande et d'abats (le lecteur intéressé pourra consulter *l'Encyclopédie de la Charcuterie* éditée par Frentz (1982) qui décrit de façon précise et détaillée les conditions opératoires requises pour élaborer). Leurs variantes industrielles permettent de produire des quantités comprises entre quelques litres et une centaine de litres de produit foisonné. Ils ne permettent pas en général un contrôle précis de la température, ni de la vitesse d'agitation, bien qu'ils disposent pour la plupart de variateurs de vitesse. Si la plupart ont une vitesse maximale de l'ordre de 1500 tours/minutes, celle-ci peut atteindre 3000 tours/min sur certains modèles de type broyeur. Etant donné le peu de résultats disponibles sur l'influence de la vitesse d'agitation, la vitesse est le plus souvent fixée

empiriquement ou en se fondant sur un savoir-faire interne à l'entreprise. En pratique, seule la durée de battage est ajustée en fonction de la matière première à foisonner.

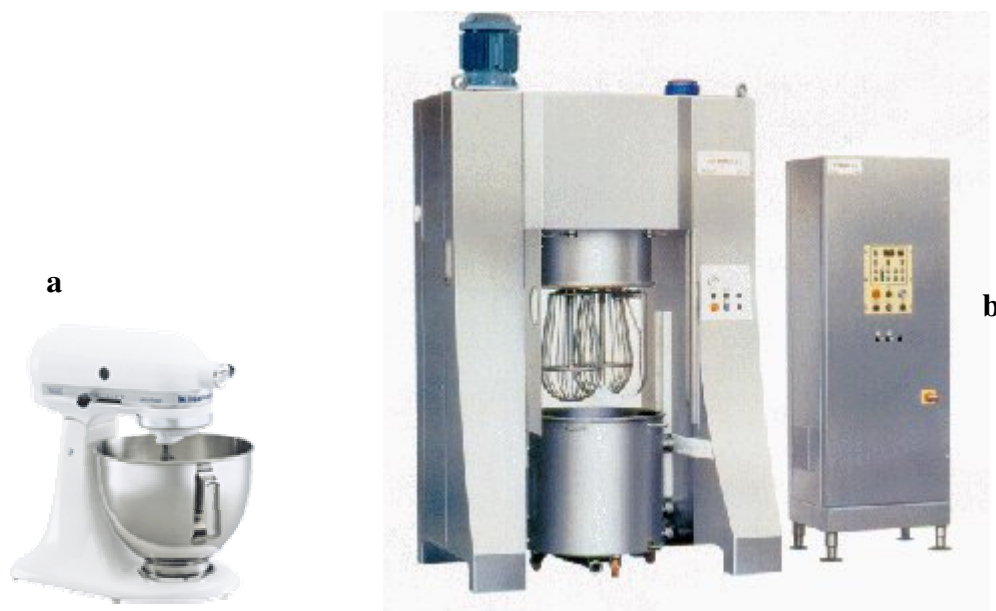


Figure I.12 : Exemples de systèmes de batteur planétaire de petit volume (a : modèle KitchenAid® KSM150) et industriel (b : Tonelli® T-300).

I.6.1.2 Procédés continus

Les deux principaux dispositifs utilisés pour l'émulsification et le foisonnement en continu sont respectivement le système de rotor-stator (RS) et l'échangeur à surface raclée (ESR). Historiquement, le système rotor-stator reste le plus utilisé, à la fois pour l'opération d'émulsification et pour celle de foisonnement ; cependant l'utilisation de l'échangeur à surface raclée dans le cas du foisonnement reste incontournable lorsque l'on désire coupler cette opération et une opération de transfert thermique, comme foisonnement et cuisson (cas de mousses de foie ; González-Méndez, 1990) ou encore foisonnement et congélation (cas de la crème glacée).

Dans la suite de cette section, nous présenterons tout d'abord un aperçu des connaissances sur les échangeurs à surface raclée dans l'industrie alimentaire. Ensuite, nous décrirons les principales caractéristiques des systèmes rotor-stator.

Echangeurs à surface raclée (ESRs)

Les ESRs sont apparus en 1928 avec le brevet *Vogt* qui décrivait un système de congélation pour la production de la crème glacée. En dehors de ce cas particulier, ils n'ont

trouvé pendant longtemps que peu d'applications dans les industries alimentaires, alors qu'ils ont été rapidement utilisés pour le chauffage ou le refroidissement de fluides visqueux dans l'industrie chimique (tels que les colles, les graisses, les cires ou les crèmes), mais également pour la séparation par cristallisation en chimie et en pétrochimie (déparaffinage des huiles en raffinerie...). Ce n'est qu'à partir des années 70 que les industries alimentaires ont redécouvert ces équipements, non seulement pour congeler ou cristalliser, mais aussi pour pasteuriser, stériliser et cuire. Les ESRs ont permis le passage en continu et l'automatisation des procédés et remplacé progressivement les cuves de refroidissement et les cuiseurs traditionnels (Härröd, 1986), d'autant plus que leur nettoyage en place ne pose pas de difficulté grâce à la simplicité des géométries des éléments internes. Malgré l'importance du foisonnement de la crème glacée, l'utilisation des ESRs comme foisonneur industriel est restée en retrait par rapport aux systèmes rotor-stator à dents, bien que leur aptitude à produire des émulsions foisonnées ait été démontrée dans de nombreux cas, tels que ceux des mousses de foie de volailles (González Méndez, 1990), de poissons, de fruits et de légumes, voire même de toppings de desserts lactés (Labbafi et al, 2005).

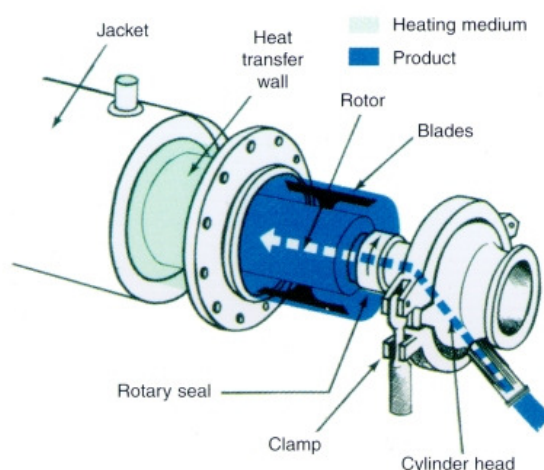


Figure I.13: Schéma de principe d'un échangeur à surface raclée.

D'un point de vue technologique, les ESRs sont constitués de deux tubes coaxiaux (figure I.13). Le produit à traiter s'écoule dans le tube intérieur qui est agité par un rotor axial équipé d'un nombre variable de lames capables de racler la paroi. Le fluide thermique (liquide froid ou chaud, vapeur d'eau, fluide frigorigène tel que l'ammoniac...) circule à co- ou à contre-courant dans l'espace annulaire entre les deux tubes. L'ensemble est souvent entouré par un troisième tube coaxial qui maintient un matériau isolant destiné à minimiser les pertes thermiques. Les lames, typiquement de deux à quatre, permettent un renouvellement continu du fluide à la paroi. En congélation ou en cuisson, elles permettent donc d'éviter la formation

de couches stagnantes qui peuvent cristalliser ou gélifier et qui pourraient réduire considérablement l'efficacité du transfert thermique.

Les principaux avantages des ESRs sont :

- la flexibilité de leur design qui permet d'obtenir des systèmes « sur mesure » adaptés à chaque application ;
- la possibilité de conduire simultanément le foisonnement et un traitement thermique sévère.

En revanche, leurs principaux inconvénients peuvent se résumer ainsi :

- l'hydrodynamique est complexe dans les ESRs, caractérisée par un grand nombre de transitions de régime ;
- l'hydrodynamique et les transitions de régime dépendent fortement de la géométrie des lames, de leur angle et notamment de l'espace entre les lames et le rotor, ce qui rend les ESRs difficiles à extrapoler.

Les échangeurs à surface raclée sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire. González Méndez (1990) a utilisé ce système pour la production de mousses de foie de porc et de foie de jambon cuit et de poisson. Van Boxtel et De Fiellietaz (1983, 1984) et Cuevas et al (1982a et 1982b) ont étudié ce type d'échangeur pour le chauffage et le refroidissement des produits carnés de forte viscosité contenant des particules de tailles différentes, de type ragoût de viande. Leurs résultats montrent qu'au niveau bactériologique et organoleptique, les échangeurs de chaleur sont mieux adaptés pour la cuisson de ces produits que les fours. Poma (1984) et Maingonnat et al (1985) ont souligné que les ESRs sont particulièrement adaptés pour traiter des quantités importantes : à titre d'exemple, 1200 kg de pâté de campagne par heure et par m² de surface d'échange peuvent être cuits dans ce type d'échangeur. De plus, la cuisson n'excède pas 3 minutes et le refroidissement ne dure qu'environ une minute.

Systèmes rotor-stator à dents

Il s'agit de systèmes mécaniques rotatifs non raclants à faible entrefer, c'est-à-dire pour lesquels la distance entre la partie statique (ou *stator*) et la partie mobile (ou *rotor*) est faible devant la dimension du stator. On peut distinguer les systèmes axiaux des systèmes radiaux (figure I.14). Les systèmes radiaux sont plutôt utilisés pour l'émulsification en continu, alors que les systèmes axiaux sont préférés pour le foisonnement en continu.

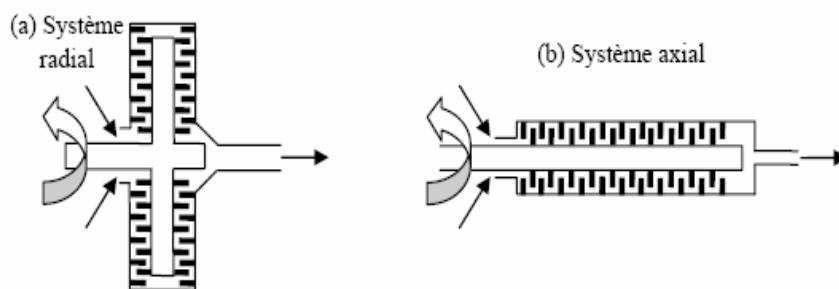


Figure I.14: Systèmes rotor-stator radiaux et axiaux.

En fait, les unités rotor-stator axiaux sont les systèmes les plus répandus pour la production en continu des émulsions et des mousses dans l'industrie agroalimentaire. On les rencontre dans des applications aussi variées que les préparations charcutières, la pâtisserie ou les desserts lactés. Pour les applications en foisonnement, le gaz est généralement injecté en amont de la tête par un simple orifice sans véritable pré-dispersion. Certains systèmes sont toutefois équipés d'une chambre de pré-dispersion du gaz qui devrait améliorer l'efficacité de la dispersion de gaz.

Si les paramètres opératoires sont les mêmes que sur un ESR, les paramètres géométriques sont par contre plus nombreux : cela est bien illustré par la figure I.15 qui représente plusieurs géométries de rotors équipés de dents.

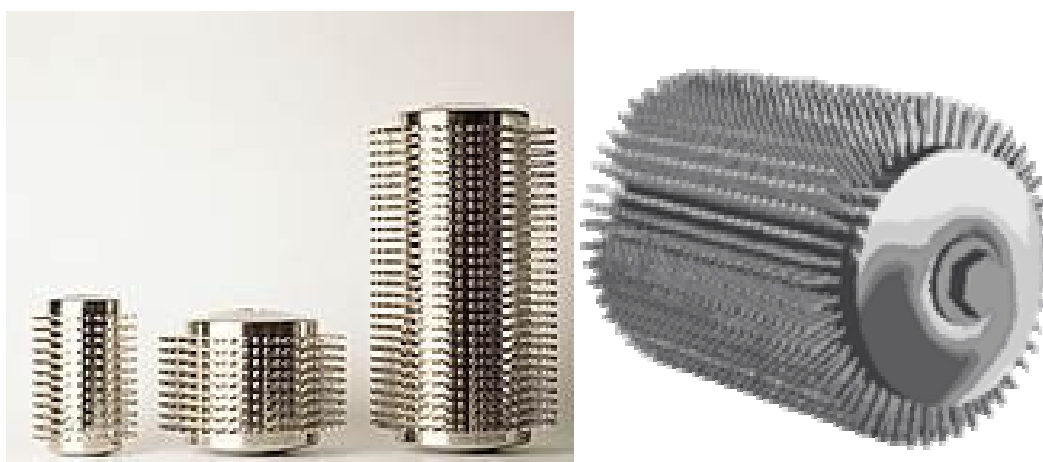


Figure I.15 : Exemples de rotors à dents (Haas-Mondomix B.V.).

En plus du diamètre du rotor et de celui du stator, il s'agit du nombre de rangées de dents⁵, du nombre de dents par rangée, mais également de la longueur des dents, de leur largeur et leur hauteur⁶, ainsi que de la distance axiale entre les rangées de dents.

Jusqu'à présent, les seules informations disponibles dans la littérature sur le mélange et la dispersion de gaz dans les systèmes rotor-stator à dents axiaux sont celles fournies par Kroezen et al, (1986, 1988a, 1988b), Windhab, (1991), Hanselmann et Windhab, (1999), ainsi que par Müller-Fischer et al, (2005 et 2007), Bouaouina et al, (2005a et 2005b) et Labbafi et al, (2005). En pratique, seules les six dernières concernent le domaine de l'agroalimentaire et seules les trois dernières se sont intéressées aux émulsions foisonnées. Il faut aussi mentionner que dans la littérature, très peu de publications traitent de l'émulsification en continu au moyen de systèmes rotor-stator.

Les paramètres opératoires sur un système rotor-stator sont les mêmes que pour les ESRs. De même que pour un ESR, il est donc également possible d'accroître la puissance dissipée en augmentant la vitesse de rotation, jusqu'à 1500 ou 2000 tours/min suivant les modèles, afin de favoriser la formation de bulles ou de gouttes plus petites. C'est pourquoi les vitesses élevées (vers 1500 tours/min) sont la règle dans l'industrie. Cependant, le temps de passage est usuellement court dans les unités rotor-stator, de l'ordre de 15 à 45 s. En conséquence, le contrôle de la température constitue la principale faiblesse des unités rotor-stator : bien qu'équipées d'une double-enveloppe, les temps de passage courts et la géométrie de la tête ne permettent pas un transfert de chaleur efficace, le système de refroidissement servant principalement à limiter l'échauffement du produit foisonné et à maintenir une température de sortie acceptable. Ce paramètre est d'ailleurs le principal facteur « non-contrôlé » qui doit être surveillé à l'échelle industrielle.

Signalons toutefois que l'objectif de notre travail n'est pas de comparer les performances de ces différents systèmes, mais plutôt de tester la capacité des protéines de coproduits animaux à être utilisées comme ingrédient fonctionnel dans les préparations alimentaires en utilisant ces dispositifs. A ce titre, un système rotor-stator sera utilisé pour étudier leur pouvoir émulsifiant des protéines dans une opération d'émulsification en continu, et un système similaire à un ESR sera mis en œuvre pour analyser leur pouvoir moussant lors d'une opération de foisonnement en continu.

⁵ c'est presque toujours le même sur le rotor et le stator.

⁶ les dents sont le plus souvent carrées.

I.7 Conclusions de la synthèse bibliographie

En conclusion, il semble que la valorisation des coproduits issus de l'abattage est encore à ce jour beaucoup plus rare que celle des autres coproduits issus de l'industrie agroalimentaire. Dans la filière la viande, la plupart des travaux ont porté sur la valorisation du sang qui a connu un grand succès commercial. Les données les plus abondantes sur la valorisation des coproduits concernent donc l'obtention de protéines à partir de plasma sanguin après séparation des cellules rouges, ainsi que la valorisation du lactosérum sous la forme de concentrats et d'isolats protéiques. Dans les deux cas, il s'agit donc de produits liquides, plus faciles à traiter que les déchets solides de l'abattage.

L'objectif de cette étude va donc être d'améliorer nos connaissances sur la valorisation des coproduits d'abattage, tels que la viande séparée mécaniquement de poulet et les poumons de bœuf. La valorisation de ces produits sous la forme d'ingrédients protéiques devra nécessairement débiter par une extraction de leurs protéines et une analyse de leurs propriétés fonctionnelles. Dans ce travail, nous serons donc amenés à nous intéresser successivement aux points suivants :

- la mise au point et l'optimisation des méthodes d'extraction, de purification et de concentration des protéines de coproduits animaux ;
- la mise au point des méthodes pour l'analyse des propriétés techno-fonctionnelles de ces protéines (par exemple, les pouvoirs gélifiant, émulsifiant, moussant et de rétention d'eau) ;
- la comparaison de ces propriétés avec celles d'ingrédients commerciaux de référence, tels que les caséinates de sodium, les protéines de lactosérum, les isolats de soja, ou les protéines de blanc d'œuf et de plasma ;
- l'étude de la capacité de ces protéines à être utilisées comme agent émulsifiant et moussant dans des produits réels, incluant des polysaccharides comme le xanthane, à la fois dans des opérations fonctionnant en mode discontinu et continu.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Matériels & Méthodes

Chapitre II

Ce chapitre présente les méthodes employées pour effectuer l'extraction et la caractérisation des propriétés fonctionnelles des protéines de coproduits utilisés dans notre travail. Nous y décrirons également les dispositifs utilisés pour la conduite des expériences d'émulsification et de foisonnement.

Dans un premier temps, nous allons présenter les méthodes d'extraction des protéines et les paramètres opératoires qui ont une influence sur le rendement de récupération protéique. Ensuite, nous allons décrire les protocoles utilisés pour la purification et la concentration des protéines extraites.

La deuxième partie de ce chapitre est dédiée aux protocoles employés pour chiffrer les propriétés fonctionnelles (pouvoirs gélifiant, moussant, émulsifiant, ainsi que le pouvoir de rétention d'eau) des protéines issues des coproduits, mais également celles des ingrédients commerciaux cités dans le chapitre I (caséinates de sodium (Na-CN), protéines de lactosérum, protéines de blanc d'œuf, de soja et de plasma de bœuf) utilisés à titre comparaison dans ce travail.

Dans cette partie, nous présenterons également les méthodes utilisées pour estimer les masses moléculaires, l'hydrophobicité, la solubilité et les tensions de surface et interfaciales des protéines.

La dernière partie de ce chapitre sera consacrée aux dispositifs (discontinus et continus) utilisés pour étudier deux opérations unitaires, l'émulsification et le foisonnement, en utilisant des formulations alimentaires complexes (protéines, huile, xanthane,...) mettant en jeu des protéines issues de coproduits animaux. Les expériences seront réalisées selon un plan d'expériences de type « split-plot » dont le principe est détaillé dans ce chapitre.

II.1 Matières premières

Deux types de coproduits ont été utilisés dans le cadre de notre travail : il s'agit de viande séparée mécaniquement de têtes de poulet (VSM) et de poumon de bœuf. Ces coproduits ont été fournis par l'ADIV ; ils ont été broyés au moyen d'un mélangeur universel *Stephan* pendant 3 minutes à 3000 tours/min, puis emballés sous vide dans des sachets en plastique et congelés à -20°C jusqu'à utilisation. La composition moyenne des coproduits en matières sèches, protéines, lipides et collagène a été déterminée par l'ADIV en utilisant les procédures standard de l'AFNOR¹. Pour la matière sèche, la norme NF V04-401 a été utilisée ; on citera également les normes suivantes : pour les protéines, NF V04-407 ; pour le collagène, NF V04-415 ; pour les matières grasses, NF V04-403.

Les protéines commerciales utilisées comme référence sont présentées dans tableau le II.1. Celui-ci résume la teneur en protéines des poudres commerciales, le fournisseur de chacune d'elles et leurs principales propriétés techno-fonctionnelles établies à partir de leurs fiches techniques.

Tableau II.1 : Liste des protéines commerciales utilisées comme référence

Protéines commerciales	Taux en protéines (% p/p)	Fournisseur	Propriétés fonctionnelles selon fournisseur
Blanc d'œuf	82	Louis François - Ingrédients Alimentaires (France)	gélifiant/liant/coagulant, moussant
Plasma de bœuf	75	Vepro 75BC (Vapran, France)	gélifiant, fixateur d'eau
Isolats de soja	86	M98 (Protein Technologies International, France)	fixateur d'eau, émulsifiant, moussant
Protéines sériques	88	Protarmor 865 (Armor Protéines, France)	gélifiant, fixateur d'eau, moussant
Caséinates de sodium	87	α-116 (Soussana, France)	épaississant, émulsifiant, moussant

II.2 Protocole d'extraction des protéines

L'extraction des protéines a été effectuée sur les différents coproduits après décongélation en utilisant un mélangeur *Stephan* UMC5 de capacité 2,5 L (figure II.1). Ce dispositif permet une régulation de la température (de 20 à 90°C) et de la vitesse d'agitation (700 à 3000 tpm). Pour la VSM, tous les tests ont été réalisés au rapport massique VSM/eau fixé à 20% (p/p). En revanche, pour le poumon de bœuf, nous avons étudié l'effet du rapport

¹ Association Française des Normes

massique poumon de bœuf/eau en utilisant les valeurs suivantes : 20, 30, 40 et 50 % p/p. Ce mélange a été d'abord homogénéisé pendant 5 min. Ensuite, l'effet du pH a été étudié : acide (~4), neutre (~7) et basique (~9). L'ajustement du pH a été réalisé par ajout d'acide chlorhydrique HCl (37% en masse) ou par l'ajout de soude NaOH (5 M). Après la détermination du rapport massique coproduit/eau et du pH optimaux, les effets de la température (20, 30 et 40°C) et de la durée d'extraction (30, 60 et 120 min) ont été également étudiés. Enfin, les protéines solubilisées ont été séparées par centrifugation à 10000g pendant 15 min à 20°C et les surnageants ont été conservés pour des analyses ultérieures.



Figure II.1 : Mélangeur Stephan UMC-5

La matière sèche dans le surnageant a été estimée en utilisant un sécheur infrarouge couplé à une balance (Precisa, HA 300, Suisse). 20 g de surnageant ont été déposés sur une plaque d'aluminium de 5 cm de diamètre, chauffée à 110°C pendant environ une heure (arrêt programmé lorsque la variation de masse au cours du temps devient négligeable). L'appareil calcule alors directement le pourcentage de matière sèche dans le produit de départ.

La concentration en protéines dans les surnageants a été déterminée par analyse colorimétrique de l'azote au moyen d'un colorimètre Hach DR890 (Allemagne) (figure II.2). La méthode consiste à convertir toutes les formes d'azote en nitrates par un ajout de persulfates en milieu alcalin. L'addition de métabisulfite de sodium, puis d'acide chromotrope conduit à la formation d'un complexe jaune. Une analyse colorimétrique à 420 nm permet alors de mesurer la concentration en azote. La concentration en protéines (en mg/L d'eau) est obtenue en multipliant la concentration en azote par 6,25. Le rendement massique de l'étape de la solubilisation de protéines (RP) a été calculé par le rapport entre la

masse des protéines récupérées dans le surnageant et la masse des protéines initiales dans le coproduit, selon la relation suivante :

$$RP (\%) = M_{\text{protéine totale récupérées}} / M_{\text{protéine initiale}} \quad (\text{II-1})$$

Chaque extraction a été effectuée au moins trois fois pour permettre une analyse statistique des données.



Figure II.2 : Colorimètre Hach pour le dosage de l'azote total.

II.3 Protocoles de concentration/purification des protéines

Dans la section suivante, nous détaillerons les deux méthodes utilisées pour la concentration des protéines. La première est basée sur l'utilisation de techniques membranaires (microfiltration) et la seconde sur la précipitation au point isoélectrique (pI) des protéines.

II.3.1 Protocoles de concentration/purification par filtration tangentielle

Il s'agit d'utiliser des techniques de séparation membranaire qui permettent la classification des particules ou des macromolécules en fonction de leur taille (figure II.3). La séparation s'effectue grâce à une différence de pression de part et d'autre de la membrane, appelée pression transmembranaire. La filtration s'opère le plus souvent en mode tangentiel, c'est-à-dire que le fluide circule parallèlement à la membrane, ceci afin de limiter l'accumulation des espèces arrêtées à la surface de la membrane, contrairement à la filtration frontale. Les protocoles de concentration/purification par filtration tangentielle ont été utilisés pour la première fois au sein de laboratoire dans le travail de Masselot (2005) pour la purification/concentration des protéines extraites de poumon de porc. Celle-ci a utilisé deux types de techniques membranaires, la microfiltration MF (1,4µm) seule ou bien la MF suivie par une ultrafiltration UF (100 ou 20 nm). Comme le montre la figure II.3, la microfiltration

devrait permettre de purifier les protéines (récupérées dans le perméat) en les séparant des bactéries et des matières grasses qui restent dans le rétentat. L'ultrafiltration permettrait ensuite de concentrer les protéines dans le rétentat de la MF en séparant l'eau qui passe dans le perméat de l'UF.

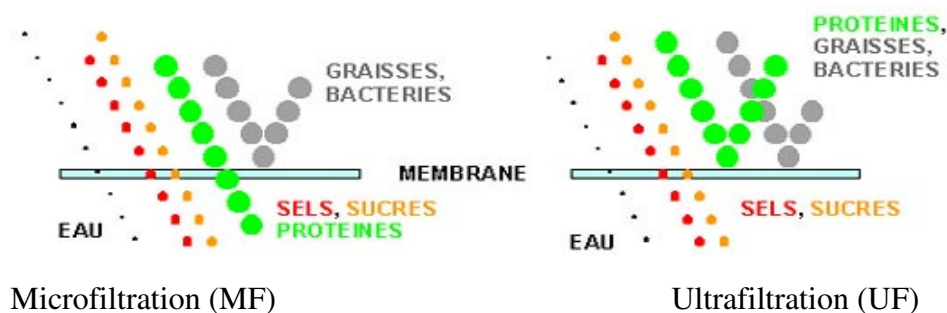


Figure II.3 : Comparaison entre microfiltration et ultrafiltration

Les essais de MF ont été effectués sur une unité pilote X-Lab 3 (Pall-Exekia, France) équipée de membranes céramiques de 0,005 m² (figure II.4). La séparation peut s'effectuer en imposant une différence de pression transmembranaire entre 1 et 2 bars et à deux températures différentes (20 et 30°C).

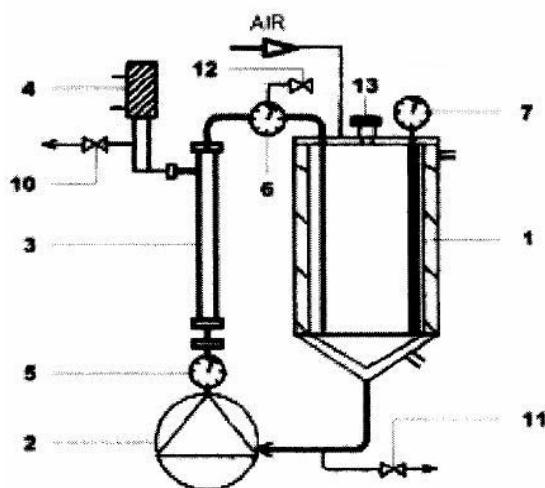


Figure II.4 : Schéma du pilote X-Lab 3 : 1- Réservoir, 2- Pompe, 3- Support membrane, 4- Décolmateur, 5 et 6- Manomètres, 7- Thermistance, 9, 10 et 11- Vanne de régulation, 12- Purge de l'air

Les concentrations en protéines dans le perméat et dans le rétentat ont été déterminées par l'analyse colorimétrique de l'azote au moyen d'un colorimètre (Hach DR890) dont le principe est détaillé en section II.2. Le rendement massique de récupération de l'étape de MF est exprimé comme le rapport entre la quantité de protéines récupérées et celle dans les coproduits initiaux.

II.3.2 Protocole de concentration/purification par précipitation isoélectrique

Le technique de séparation par membrane n'est pas adaptée lorsque les coproduits sont riches en matières grasses. Dans ce cas, il est possible d'utiliser une technique alternative basée sur la précipitation au point isoélectrique (pI) de la majorité des protéines. Il s'agit en effet de faire précipiter les protéines après l'étape de la solubilisation en ajustant le pH du surnageant au pI de la majorité des protéines (≈ 4). La suspension est soumise ensuite à une centrifugation à 5000g pendant 5 min pour la VSM et à 10000g pendant 20 min pour le poumon de bœuf (Swingler et Lawrie, 1979). Les protéines précipitées sont séparées sous forme de pâte. Les protéines obtenues à partir de la VSM de poulet ont été purifiées par une étape d'extraction de la matière grasse à cause de leur teneur élevée en lipides. L'extraction des lipides a été réalisée avec des solvants organiques de type hexane et isopropanol dans un rapport volumique 3/2. Pour cette étape, nous avons utilisé un rapport massique protéines précipitées (culot)/solvant de 1/5. L'extraction a été effectuée sous agitation mécanique pendant 1 heure à 20°C. Les protéines sont ensuite récupérées par évaporation du solvant en utilisant un évaporateur rotatif (BÜCHI, Rotavapor-R).

Les protéines de poumon de bœuf obtenues par précipitation sous forme d'une pâte ont été lyophilisées grâce à un lyophilisateur commercial (Heto Power Dry PL6000-90, Thermo Electron, France). Les protéines lyophilisées ont été nommées PCPB. Les compositions en protéines et en lipides dans la poudre finale ont été déterminées par l'ADIV en suivant les procédures d'AFNOR citées précédemment (I.1). Le rendement massique de la récupération totale des protéines est donné à nouveau par la relation II-1.

II.4 Propriétés fonctionnelles des protéines

Parmi les diverses propriétés fonctionnelles, nous avons choisi d'étudier les propriétés suivantes : pouvoirs gélifiant, émulsifiant et moussant pour les protéines extraites de la VSM et celles de poumon de boeuf. Nous avons également étudié le pouvoir de rétention d'eau

uniquement pour les protéines concentrées de poumon de bœuf (PCPB). Ces propriétés ont été comparées avec les protéines commerciales de référence (tableau II.1).

II.4.1 Propriétés gélifiantes

La température de gélification des protéines en solution et la force du gel ont été déterminées pour une concentration standard en protéines (2% p/p). La méthode repose sur une analyse de l'évolution du comportement viscoélastique de ces solutions en fonction de la température. Pour cette étude, un rhéomètre (SR5, Rheometric Scientific, USA) à contrainte imposée a été utilisé en mode oscillatoire (figure II.5). La géométrie de mesure choisie est le système plan-plan (diamètre du plan : 40 mm). Le plateau inférieur est thermostaté à l'aide d'un système à effet Peltier. L'expérience consiste à mesurer en mode dynamique l'évolution du module élastique G' en fonction de la température (qui évolue selon une rampe à $+2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) à amplitude de déformation et à fréquence d'oscillations fixées, respectivement à 1% et à 1 Hz. La température de gélification est celle qui correspond au moment où le module d'élasticité augmente brutalement lors de la rampe de température. De même, la force de gel correspond à la valeur maximale de G' avant que celle-ci chute sur la courbe G' vs. T .

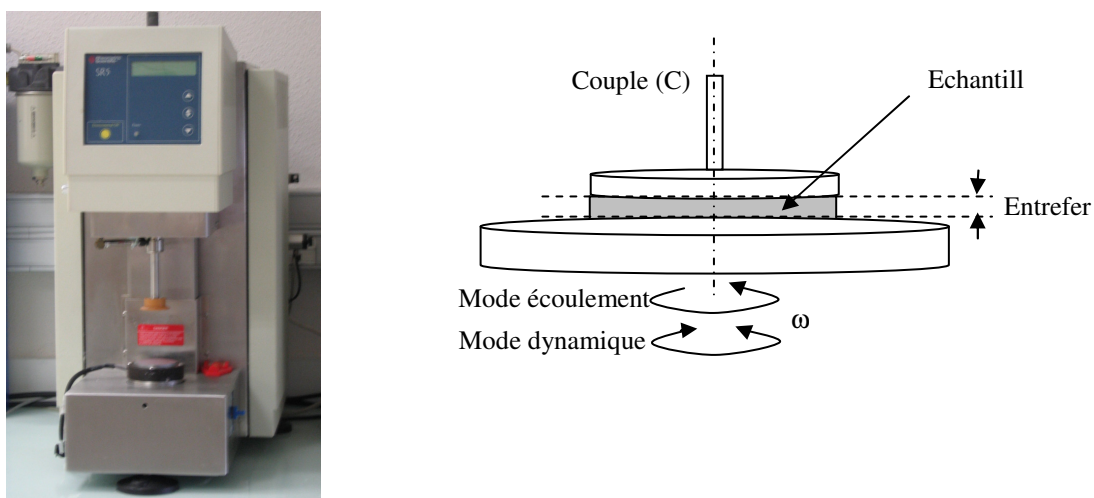


Figure II.5 : Cellule de mesure du rhéomètre SR-5

II.4.2 Propriétés moussantes

La méthode de Coffman et Garcia (1977) a été utilisée pour mesurer le pouvoir moussant des protéines dans l'eau. Une solution protéique à 2% (p/p) a été préparée et placée dans une éprouvette ; elle est ensuite soumise à une agitation mécanique intense à l'aide d'un

système rotor-stator (T25, Ultra-Turrax, figure II.6) pendant 2 minutes et à 13000 tour/min. Le pouvoir moussant (FA), exprimé en pourcentage, est calculé à partir de l'augmentation de volume due à l'incorporation du gaz en utilisant la relation suivante :

$$FA[\%] = 100 \cdot \frac{V_M - V_L}{V_L} \quad (\text{II-2})$$

V_L et V_M représentent respectivement le volume initial du liquide et le volume de la mousse obtenue. La stabilité moussante (FS), exprimée en minutes, s'obtient après avoir déterminé FA. Elle correspond au temps nécessaire pour que le volume de mousse diminue de moitié.

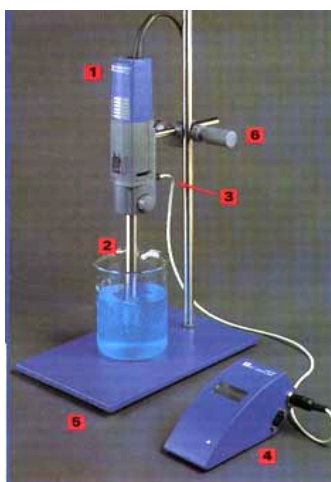


Figure II.6 : Unité rotor-stator (Ultra-Turrax)

II.4.3 Propriétés émulsifiantes

II.4.3.1 Capacité émulsifiante

La capacité émulsifiante (EC) a été mesurée par une méthode dérivée du travail de Thakur et al, (2008). Une solution protéique à 2% p/p enrichie à 1% p/p de NaCl est préparée ; son pH a été ajusté à 7. Ensuite, l'huile de tournesol est ajoutée sans interruption à la solution protéique sous agitation par Ultra-turrax pour assurer son émulsification. En même temps, sa conductivité est mesurée avec un conductimètre CDM210 (Radiometer Analytical, France) et tracée en fonction de la fraction volumique d'huile ϕ . La capacité émulsifiante est définie comme le volume maximal d'huile qui peut être émulsionné par un gramme de protéines avant d'atteindre le point d'inversion de phase ; elle correspond à une chute brutale de la conductivité de l'émulsion.

II.4.3.2 Activité émulsifiante

L'activité émulsifiante (EA) qui mesure la capacité des protéines à s'adsorber facilement sur les interfaces des gouttelettes d'huile a été mesurée par la méthode de Moure et al. (2002). Elle consiste à préparer une solution protéique à 0,1% à pH 7, à prélever 20 mL de cette solution, puis à ajouter 6,6 ml d'huile de tournesol par mélange à l'Ultra-turrax. Ensuite, 50 μ L de ce mélange sont prélevés et dilués dans 5 mL de SDS (sodium dodecyl sulfate) à 0,1%. On mesure alors l'absorbance A_0 de la solution avec un spectrophotomètre UV-Vis (Safas, type MC2, Monaco) à une longueur d'onde de 500 nm qui est fonction de la turbidité des l'émulsion et donc du diamètre moyen de gouttelettes. EA est obtenu par l'équation suivante :

$$EA = 2,303.A_0 \quad (\text{II-3})$$

On peut également chiffrer l'activité émulsifiante à partir de l'indice d'activité émulsifiante EAI en utilisant la relation suivante :

$$EAI[m^2.g^{-1}] = \left(\frac{2,303 * A_0}{L} \right) \cdot \frac{2 * d}{10^6 * C * \varphi} \quad (\text{II-4})$$

Dans cette relation, L (10^{-2} m) est la longueur de la chambre d'absorption, C la concentration en protéines ($C=10^{-3}$ g/mL), φ la fraction volumique de l'huile ($\varphi=0,25$) et d est le facteur de dilution ($d=100$).

Une fois EAI ou EA déterminés, il est possible de chiffrer l'indice de la stabilité de l'émulsion (ESI) en mesurant la diminution de l'absorbance de ces émulsions 10 minutes après leur préparation. En effet, la coalescence et le crémage gravitaire des gouttelettes sont les deux phénomènes principaux menant à la déstabilisation d'émulsion qui provoquent la diminution de sa turbidité. ESI est exprimé en minutes et il est calculé par la relation suivante :

$$ESI[min] = 10 \cdot \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (\text{II-5})$$

où A_{10} est l'absorbance à 500 nm mesurée au bout de 10 minutes. Notons que pour estimer l'incertitude expérimentale, chaque expérience a été répétée au moins trois fois.

II.4.4 Pouvoir de rétention d'eau (PRE)

La méthode de Moure et al. (2002) a été utilisée pour la détermination du pouvoir de rétention d'eau des protéines. Pour ce test, une solution de protéines à 1% p/p a été

homogénéisée pendant 30 min, son pH a été ensuite ajusté à 7 en utilisant une solution de NaOH (5M). La solution est encore laissée sous agitation à 20°C pendant 30min au moyen d'un agitateur mécanique (Ika, RE16, Allemagne). La solution est ensuite centrifugée à 5000g pendant 30 min. Le volume d'eau retenu par les protéines a été mesuré en comparant le volume du surnageant au volume d'eau initial. Les expériences ont été répétées trois fois pour pouvoir effectuer une analyse statistique des résultats.

II.5 Propriétés physico-chimiques des protéines extraites

Cette section décrit les mesures des propriétés physico-chimiques des protéines concentrées de poumon de bœuf (PCPB) telles que la solubilité, les masses moléculaires, l'hydrophobicité de surface et les tensions de surface et interfaciales.

II.5.1 Mesure de la solubilité

La solubilité protéique a été déterminée par la méthode de Beuchat (1977). Pour chaque test, 2 g de protéines ont été dilués dans 100 mL d'eau distillée ; le pH des solutions a été ajusté à la valeur désirée, usuellement dans une gamme comprise entre 3 et 9 de façon à estimer l'effet du pH sur la solubilité, par ajout d'acide chlorhydrique HCl (37%) ou de soude NaOH (5M). Ces solutions ont été maintenues à 20°C pendant 45 min sous agitation mécanique. Ensuite, les solutions ont été centrifugées à 9750g pendant 10 min. La teneur en azote dans les surnageants a été dosée par la méthode colorimétrique décrite section II.3.1 (Hach DR890, Allemagne). L'influence de la concentration en protéines sur la solubilité a été également étudiée en variant la teneur en protéines entre 1% et 6% (p/p) à pH fixé, par exemple à pH 7. La solubilité relative a été définie comme le rapport de la quantité d'azote soluble sur l'azote total ; elle est exprimée en pourcentage. La solubilité absolue a été calculée en multipliant la teneur en azote dans le surnageant par un facteur 6,25 ; elle est exprimée en g/L. Chaque test a été effectué trois fois pour étudier la reproductibilité des mesures.

II.5.2 Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation et éventuellement l'identification des constituants d'un mélange de protéines en utilisant la différence entre leurs vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique. Celle-ci est, sous certaines conditions, uniquement fonction de leur masse moléculaire. La cartographie des masses moléculaires des protéines peut donc être établie en utilisant une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulphate de sodium (SDS-PAGE). Le SDS (détergent anionique) a deux fonctions : d'une part, dissocier les protéines agrégées et, d'autre part, leur

conférer une charge globale négative, permettant la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur poids moléculaire. Son action n'est pas cependant efficace qu'en présence d'un réducteur de ponts disulfures, le 2-mercaptoéthanol. La méthode consiste à préparer une solution de protéines de 1% (p/p) à pH 7. Cette solution est utilisée directement ou après filtration à 0,45µm pour étudier uniquement la fraction soluble. Dans les deux cas, 20 µL de la solution ont été dilués dans 80 µL d'un tampon phosphate de sodium à 0,01M à pH 8,3. Puis, 25 µL d'une solution contenant le SDS, le 2-mercaptoéthanol, du glycérol et du bromophénol ont été ajoutés à chaque échantillon. Le mélange est porté à 95°C pendant 5 min. Par ailleurs, un mélange de marqueurs de poids moléculaires compris entre 10 kDa et 250k Da a été utilisé pour étalonnage.

Les protéines ont été séparées sur un gel à 12% de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire après application d'un champ électrique de 200V à 4°C pendant 2 heures. Les bandes protéiques sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie G. Les gels sont ensuite scannés et les bandes sont analysées grâce à un logiciel dédié (Quantity One, BioRad, USA).

II.5.3 Chromatographie d'exclusion stérique (GPC)

La chromatographie d'exclusion stérique ou chromatographie de perméation sur gel (GPC) est une méthode largement utilisée pour caractériser la distribution des masses moléculaires des macromolécules. La solution protéique est amenée à traverser une colonne chromatographique remplie d'un gel poreux de type « tamis moléculaire ». Le diamètre des pores est choisi afin de sélectionner les macromolécules selon leur taille. En effet, plus les macromolécules sont grosses, plus le volume poreux auquel elles ont accès est faible, c'est-à-dire que leur temps de séjour dans le gel est d'autant plus court. Les solutions protéiques de PCPB à 2% p/p ont été filtrées sur une membrane à 0,45 µm afin de ne pas colmater la colonne, puis injectées à 20°C dans le chromatographe (Akta FP, Amersham Biosciences, UK). La colonne utilisée est la Superdex 200 10/300. L'éluant est un tampon phosphate à pH 7 avec 150 mM de NaCl qui circule dans la colonne au débit de 0,75 mL/min. Afin de déterminer les poids moléculaires de ces protéines, nous avons élué un mélange de protéines de poids moléculaires connu (thymoglobuline 670 kDa, gammaglobuline 158 kDa, ovalbumine 44 kDa, myoglobine 17 kDa et vitamine B12 1,35 kDa) dans les mêmes conditions de température et de débit d'élution. Les protéines éluées ont été détectées par mesure de l'indice de réfraction et de l'absorbance à 280 nm. Une courbe d'étalonnage a été

obtenue en traçant les volumes élués pour chaque marqueur protéique en fonction du logarithme de sa masse moléculaire. Lors des mesures, la masse moléculaire de chaque fraction protéique a été déterminée en combinant le volume d'élution de chaque pic du chromatogramme à la courbe d'étalonnage.

II.5.4 Mesure de l'hydrophobicité de surface

La mesure de l'hydrophobicité de surface par fluorescence à l'ANS (anilinonaphtalène-8-sulfonate) est un moyen pour définir l'état structural des protéines en surface au niveau de leur structure tertiaire. La réaction mise en jeu entre l'ANS et les acides aminés hydrophobes accessibles des protéines provoque la formation d'un complexe fluorescent après excitation à 390 nm qui émet à 470 nm. La méthode utilisée est une variante de la méthode de Kato et Nakai (1980). Les échantillons sont dilués dans un tampon phosphate à 20 mM de pH 7 de manière à obtenir différentes concentrations dont les densités optiques sont comprises entre 0,05 et 0,2 à la longueur d'onde d'excitation (390 nm). 15 µL d'ANS (8 mM) doivent alors être ajoutés à 1 mL de chaque échantillon dilué. La lecture est faite à l'aide d'un spectrofluorimètre Flx (Safas, Monaco) en mode angle droit avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 390 et 470 nm, la taille des fentes étant fixée à 5 nm. L'hydrophobicité de surface a été calculée en traçant l'intensité relative de fluorescence en fonction de la concentration en protéines. Ce paramètre correspond à la pente initiale de la courbe qui a été estimée par régression linéaire. Trois séries de dilution sont effectuées afin de déterminer l'incertitude expérimentale.

II.5.5 Mesure des tensions de surface et interfaciale

Les mesures de la tension de surface (gaz/liquide) et de la tension interfaciale (liquide/liquide) ont été effectuées en utilisant un tensiomètre statique K12 (Krüss GmbH, Allemagne) équipé par une lame de Wilhelmy. Pour cette méthode, une lame verticale en platine est suspendue à l'un des bras d'une balance et partiellement immergée dans la solution dont on veut mesurer la tension de surface ou la tension interfaciale. Lorsqu'on opère selon la méthode d'arrachement, le récipient contenant le liquide est abaissé progressivement et on note la force maximale s'exerçant sur la balance au point d'arrachement (figure II.7). Pour les mesures de tension interfaciale, de l'huile de tournesol a été utilisée comme phase organique, l'arrachement étant alors étudié à l'interface eau-huile. L'évolution de la tension interfaciale a été suivie en fonction du temps pour une période comparable à celle de la stabilité

émulsifiante utilisée (10 min). De même, pour les mesures de tension de surface, l'équilibre n'a pas pu être réalisé rapidement. La courbe de tension de surface a montré une diminution lente en fonction du temps, résultant des réarrangements lents des protéines aux interfaces. Les valeurs ont été mesurées après 180 s. Trois séries de mesure sont effectuées afin d'estimer les incertitudes expérimentales.

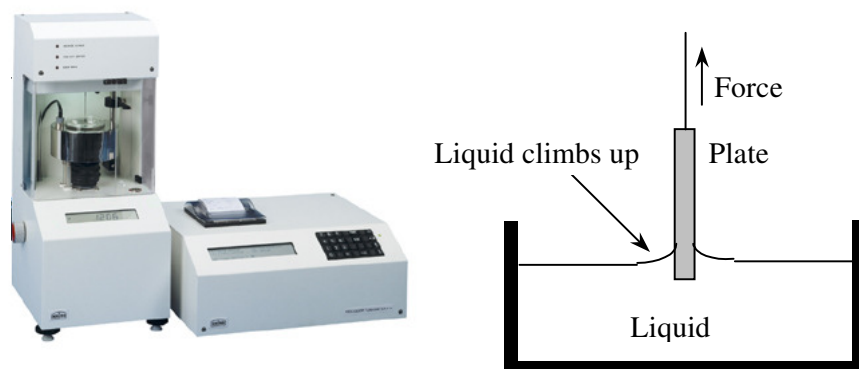


Figure II.7 : Schéma du tensiomètre statique

II.6 Application des protéines extraites à l'émulsification en continu

Un des aspects important pour les applications industrielles est la compatibilité entre les ingrédients dans une formulation complexe. Dans le cas présent, il s'agit de vérifier si les protéines extraites dans le cadre de ce travail conservent leurs fonctionnalités en présence d'un agent épaississant : le xanthane. A titre d'exemple, nous avons considéré deux opérations unitaires fréquemment employées dans l'industrie alimentaire qui permettent de tester comment les fonctionnalités évoluent : l'opération d'émulsification qui sera décrite dans cette section et celle de foisonnement que nous détaillerons plus loin (II.7). Nous allons dans ce qui suit donner la démarche expérimentale que nous avons choisie pour mettre en œuvre l'émulsification en continu en présence de protéines extraites de poumon de bœuf et de xanthane.

II.6.1 Préparation et caractérisation de la phase aqueuse

Pour la phase aqueuse de l'émulsion, des solutions de protéines à différentes concentrations (1, 2 ou 3% p/p) avec 0,1% p/p de chlorure de sodium ont été préparées par dissolution dans 750 mL d'eau distillée après agitation pendant 3 heures ; le pH de chaque solution a été ajusté à 7 par l'ajout de NaOH (5M). Pendant ce temps, le xanthane a été

hydraté dans 250 mL d'eau à différentes concentrations (0,1, 0,15 ou 0,2% p/p). Les deux solutions sont ensuite mélangées sous agitation mécanique modérée pendant une nuit à température ambiante. A chacune des solutions, nous avons ajouté de l'azoture de sodium (0,02% p/p) afin de pouvoir les conserver plus longtemps avant utilisation. Le caséinate de sodium a été utilisé comme référence en qualité d'agent émulsifiant protéique commercial par excellence. L'influence de la concentration en protéines (1, 2 ou 3% p/p) et en xanthane (0,1, 0,15 ou 0,2% p/p) sur les propriétés rhéologiques et interfaciales des phases aqueuses a été étudié en utilisant un plan d'expériences factoriel de type 2^2 avec trois répliques du point central (2% et 0,15% p/p). Les facteurs principaux, i.e. les teneurs en protéines et en xanthane, exprimées en pourcentage, sont notés respectivement X1 et X2 dans ce travail. Le codage des niveaux pour X1 et X2 est reporté dans le tableau II.2. Les points centraux (codés 0) correspondent aux moyennes arithmétiques des niveaux haut (+1) et bas (-1) du plan pour chaque facteur. Le niveau de signification des facteurs dans le modèle linéaire a été étudié en utilisant la méthode de l'ANOVA (analyse de la variance) avec *Matlab* 6.5 (The MathWorks, USA). Les répliques du point central sont utilisées pour distinguer l'erreur aléatoire, ou erreur pure, du défaut d'ajustement résultant du choix du modèle (le « lack-of-fit »). Les niveaux de signification des facteurs ont été exprimés en termes de p-valeurs (p). Comme usuel dans ce type d'analyse statistique, nous avons supposé que les contrastes sont significatifs si $0,01 \leq p \leq 0,05$ (*) et fortement significatifs si $p \leq 0,01$ (**). En revanche, le défaut d'ajustement du modèle peut être négligé lorsque $p \geq 0,05$ pour un test sur le « lack-of-fit ».

Les propriétés rhéologiques et interfaciales des phases aqueuses ont été caractérisées à partir de leur viscosité apparente et de leur tension interfaciale. La viscosité a été mesurée en utilisant un rhéomètre à contrainte imposée (voir section II.4.1) en mode écoulement avec une géométrie plan-plan de 40 mm de diamètre. L'entrefer utilisé est compris entre 0,5 et 1 mm. La phase continue a toujours présenté un comportement rhéofluidifiant qui suit une loi puissance :

$$\mu = k \gamma^{n-1} \quad (\text{II-6})$$

où μ est la viscosité apparente en Pa.s, γ est le gradient vitesse en s^{-1} , k est l'indice de consistance et n l'indice d'écoulement. Les propriétés interfaciales de la phase aqueuse ont été déterminées à l'aide d'un tensiomètre K-12 (Krüss GmbH, Allemagne) en suivant le même protocole que présenté au paragraphe II.5.5. L'évolution de la tension interfaciale en fonction de temps a été suivie pendant 10 min à 20°C.

Tableau II. 2: Codes des facteurs et de leurs niveaux pour les plans d'expériences.

Facteur	Code du facteur	Codes des niveaux		
		-1	0	+1
Protéines (% p/p)	X ₁	1	2	3
Xanthane (% p/p)	X ₂	0,1	0,15	0,2
N (tpm)	X ₃	800	1150	1500
θ (min)	X ₄	2,0	3,4	4,8

II.6.2 Émulsion : préparation en continu et caractérisation

Comme phase dispersée, nous avons utilisé de l'huile commerciale de tournesol, fréquemment employée dans les préparations alimentaires, à 15% (p/v). L'émulsification en continu a été effectuée sur une installation de laboratoire constituée d'un système rotor-stator (figure II.8). Le diamètre du stator est de 35 mm. Le rotor et le stator sont munis de sept rangées de six dents à bouts carrés (7,5×4×4 mm). L'entrefer entre le rotor et le stator est de 2,5 mm. Le système est muni d'une double enveloppe dans laquelle circule un réfrigérant qui permet de maintenir la température constante. Le rotor est relié à un moteur IK LaborTechnik RE-16 (Ikawerke, Allemagne) et à une jauge de contrainte IK MR-D1 (Ikavisc, Allemagne). Les deux phases, aqueuse et organique, ont été introduites séparément dans le rotor-stator à l'aide de deux pompes péristaltiques. Les débits des deux phases ont été déterminés pour former une émulsion à 15% d'huile en volume. Le temps de séjour (θ) a été estimé par l'expression suivante :

$$\theta = \frac{V_R}{F_C + F_D} = \frac{V_R}{1,176.F_C} \quad (\text{II-7})$$

où V_R est le volume effectif du rotor-stator (140 mL). F_C et F_D sont respectivement les débits de la phase continue et de la phase dispersée (huile).

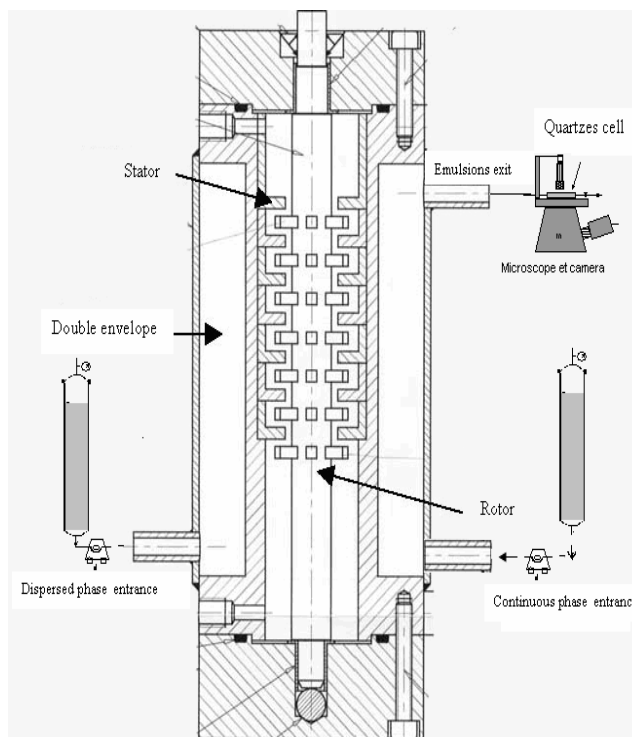


Figure II.8 : Schéma de l'unité rotor-stator

Les émulsions obtenues à la sortie du dispositif ont été caractérisées à partir de leur viscosité, du diamètre moyen en surface des gouttes ou diamètre de Sauter (d_{32}) et de leur stabilité en fonction de temps. La viscosité des émulsions a été déterminée en utilisant la méthode décrite dans la section II.6.1.

Afin d'estimer la taille moyenne et la distribution de taille des gouttelettes d'huile, une fraction de l'émulsion formée en continu a été dirigée dès la sortie du rotor-stator vers une cellule de visualisation en quartz. Celle-ci est couplée à un système d'analyse d'images en ligne. Il s'agit d'une caméra CCD (Kappa Opto-Electronics GmbH, Allemagne) montée sur un microscope inversé (Axiovert-25, Carl Zeiss Jena GmbH, Allemagne) (figure II.9). Une fois les diamètres (d_i) obtenus à l'aide du logiciel Image Pro+ 4.01 (MediaCybernetics, MD, USA), un diamètre moyen de Sauter (d_{32}) correspondant au diamètre moyen en surface a été calculé à partir d'au moins 500 échantillons relevés sur trois images différentes. d_{32} a été estimé à partir de l'équation suivante :

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^3}{\sum_{i=1}^n d_i^2} \quad (\text{II-8})$$

Pour la mesure de stabilité, juste après la préparation, un échantillon de l'émulsion a été placé dans un tube de verre fermé de 25 mL pour prévenir l'évaporation de l'eau. L'échantillon a été

maintenu à la température ambiante et la séparation de phase grasse a été suivie en fonction du temps. Le volume d'huile séparé après 24 h a été utilisé comme indicateur de la stabilité de l'émulsion.

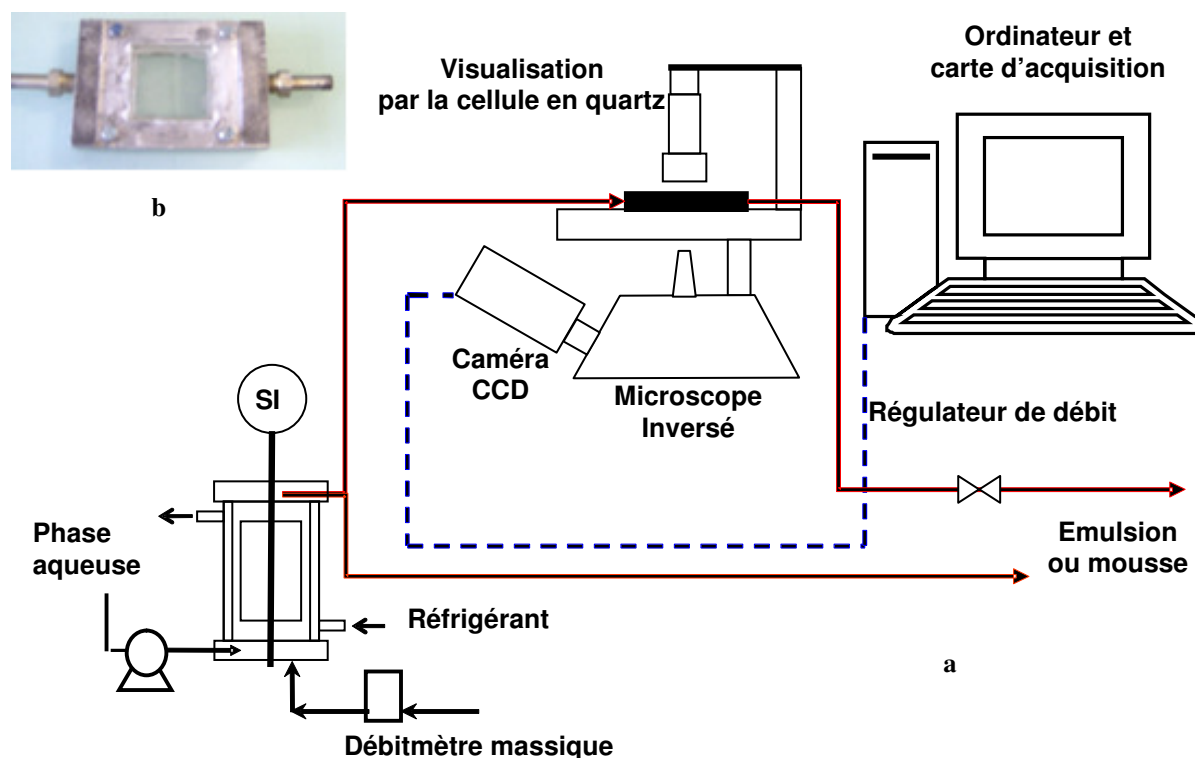


Figure II.9 : Système d'analyse d'images (a) et cellule de visualisation (b).

II.6.3 Méthodologie d'étude du couplage formulation/procédé

L'influence combinée de la formulation et du procédé sur les propriétés des émulsions obtenues en continu à la sortie de l'unité rotor-stator (telles que le diamètre moyen d_{32} , les propriétés rhéologiques et la stabilité) a été étudiée en utilisant un plan d'expériences de type split-plot. Cela signifie qu'une restriction de randomisation des essais a été appliquée entre, d'une part, les variables de formulation, et d'autre part celles du procédé (Ryan, 2007). Les paramètres de procédé étudiés, tels que la vitesse d'agitation et le temps de séjour, sont respectivement notés X3 et X4 et leurs niveaux ont été reportés dans le tableau II.2.

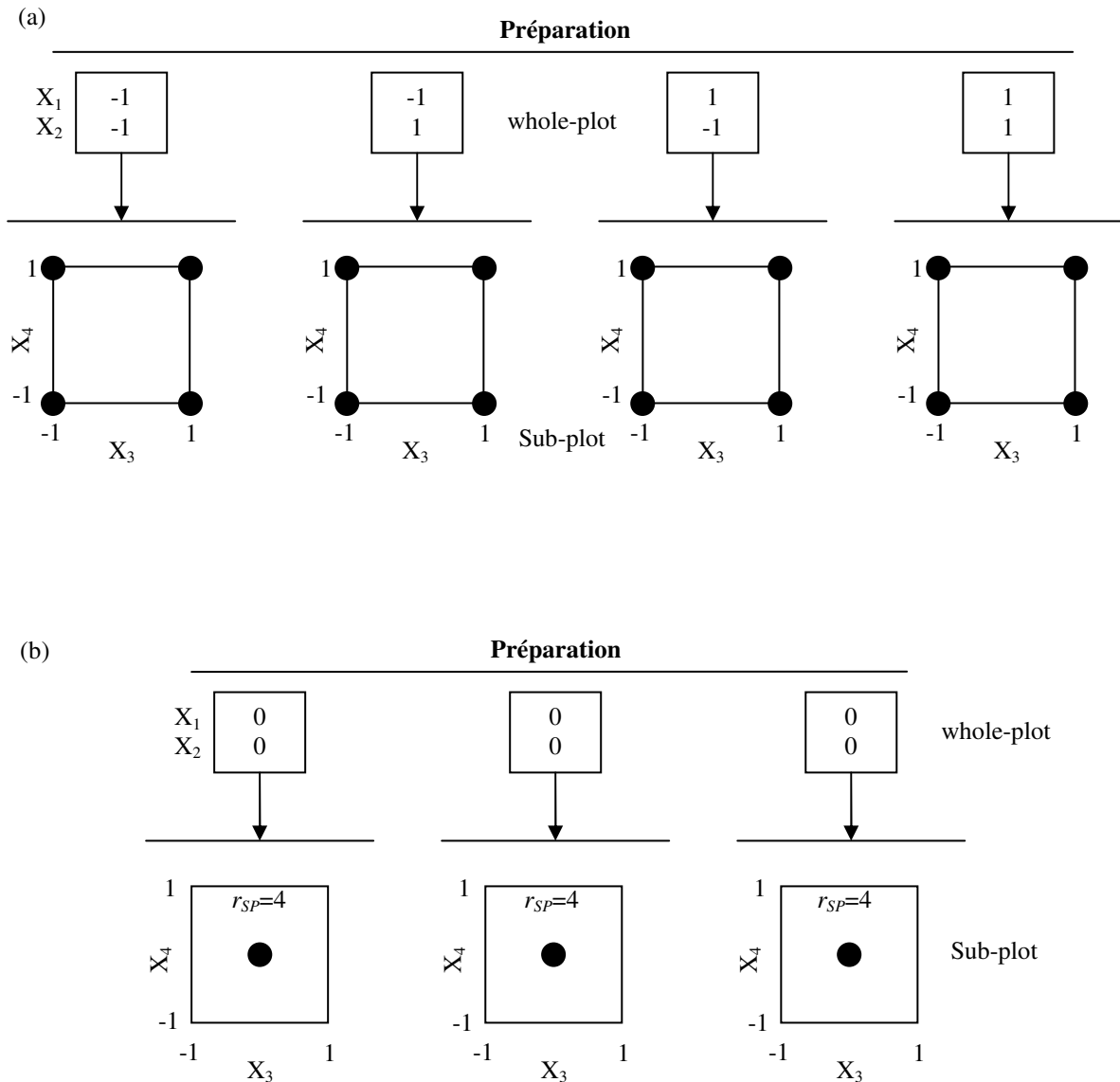
En fait, un plan factoriel 2^4 avec trois réplications r n'a pas été réalisé parce que cela requiert $2^4 + r$ préparations nécessitant 2 L de solution pour chaque expérience. La quantité de protéines extraites de poumon de bœuf étant limitée par les expériences d'extraction, la même solution aqueuse a été utilisée pour l'ensemble des niveaux des variables procédé X3 et X4 à

X1 et X2 fixés. X1 et X2 ont donc été traités comme des facteurs « difficiles à modifier » (Kowalski et al, 2006; Ryan, 2007). Il en résulte que le plan d'expériences présente une structure hiérarchique dans laquelle les niveaux des variables X3 et X4 sont modifiés au sein d'un bloc (X1, X2) correspondant à une unique préparation de solution protéique, i.e. en utilisant le même batch de phase aqueuse. Contrairement à un plan factoriel 2^4 qui aurait nécessité 16 préparations, seulement quatre sont donc nécessaires ; elles correspondent aux quatre blocs présentés sur la figure II.10a. X1 et X2 constituent le « whole-plot », tandis que X3 et X4 appartiennent au « sub-plot » (Montgomery, 2001). La randomisation des essais est donc limitée aux variables du procédé.

Comme la montre la figure II-10b, le point central du « whole-plot » ($X1=X2=0$) a été répété trois fois ($r_{wp}=3$). Chaque essai au point central du « whole-plot » a été effectué au point central du « split-plot » ($X3=X4=0$) et a fait l'objet de quatre réplifications ($r_{sp}=4$), ce qui a permis de maintenir un plan d'expériences équilibré. Cette dernière propriété permet l'application d'une ANOVA modifiée dans laquelle tous les degrés de liberté conservent des valeurs entières. Le plan d'expériences se compose donc au final de $2^4 + r_{WP} \times r_{SP} = 28$ essais. L'analyse du « whole-plot » a été effectuée comme pour un plan factoriel 2^2 conventionnel avec trois répétitions du point central, en utilisant comme réponse pour un couple (X1, X2), la moyenne des quatre essais correspondant aux différents niveaux de X3 et X4. L'estimation de l'erreur pure dans le « whole-plot » a été obtenue à partir des r_{WP} réplifications du point central $X1=X2=0$; cette estimation a été utilisée pour calculer les p-valeurs associées aux paramètres principaux X1 et X2 et à leur interaction X1·X2.

Pour analyser l'influence des paramètres procédé, nous nous sommes intéressés aux résultats des « sub-plot ». A cette fin, nous avons seulement pris en considération l'effet des paramètres principaux (X3 et X4), de leur interaction de deuxième ordre (X3·X4) et des interactions de deuxième ordre entre un facteur du « whole-plot » (X1 ou X2) et un des facteurs du « sub-plot » (X3 ou X4). Les interactions de degré plus élevé ont été négligées. L'estimation de l'erreur pure du « sub-plot » a été obtenue en étudiant la variabilité entre les r_{SP} réplifications dans chacun des r_{WP} « sub-plot » effectués au point central $X1=X2=0$ de la figure II.10b. L'erreur pure liée au « sub-plot » a été utilisée pour l'estimation des p-valeurs des tests d'hypothèse sur la nullité des prédicteurs correspondant aux paramètres procédé. Des tables d'ANOVA tenant compte des deux niveaux erreur, respectivement sur le whole-plot et le sub-plot, ont donc été reconstruites à partir des données expérimentales afin d'analyser les plans split-plot. *Matlab 6.5* (The MathWorks, USA) a été utilisé, comme précédemment, pour les applications numériques.

Figure II.10 : (a) Plan d'expériences split-plot sans réplication avec quatre facteurs, deux dans le « whole-plot » et deux dans le « sub-plot » ; (b) Plan complémentaire : trois répétitions du point central du « whole-plot » ($r_{WP}=3$) et quatre répétitions du « sub-plot » ($r_{SP}=4$).



II.7 Application des protéines extraites à l'opération de foisonnement en continu

Une autre application que nous étudierons dans ce travail est le procédé de foisonnement ; son but est de tester la capacité des protéines concentrées de poumon de bœuf (PCPB) à former une mousse alimentaire dans un système discontinu en utilisant un robot ménager et en continu. Pour réaliser les expériences en continu, nous avons utilisé une colonne de foisonnement disponible au laboratoire. En effet, cette unité a déjà servi à réaliser le foisonnement sur une formulation similaire à celle utilisée dans ce travail, mais à partir de protéines laitières. Cela permettra de comparer les performances des protéines extraites de coproduits animaux à celles des protéines de lait en éliminant l'effet de l'installation.

II.7.1 Formation de mousse en discontinu

La composition initiale des formulations utilisées dans ce travail a été inspirée des travaux de Thakur (2003), le but étant de remplacer les protéines utilisées dans la formulation définie par l'auteur (caséinates de sodium et protéines de lactosérum) par les PCBP. Nous avons étudié dans un premier temps l'effet de la présence de xanthane (0,25% p/p) et de guar (0,25% p/p), ensemble ou séparément, sur le taux de foisonnement (Φ), ainsi que celui de l'amidon (entre 3 et 6% p/p). Ensuite, l'effet de l'ajout d'huile (5 et 15% p/p) sur Φ a été également étudié dans ces mêmes formulations. Les compositions initiales de toutes les formulations sont résumées dans le chapitre IV (section IV.5.6, tableaux IV.13, IV.14 et IV.15).

Pour toutes ces formulations, nous avons étudié l'effet de l'augmentation de la durée de foisonnement (5, 10, 15 et 20 min) sur le taux de foisonnement.

Les formulations ont été préparées en dispersant les protéines et le sel dans l'eau distillée pendant une nuit sous agitation mécanique modérée (IKA-Labortechnik, RE 16) à température ambiante. Après ajustement du pH à 7, les protéines hydratées ont été mélangées avec les polysaccharides dans un mélangeur *Stephan* UMC5 à 750 tpm pendant 30 secondes. Ensuite, l'huile de tournesol a été ajoutée et dispersée pendant 150 secondes sous vide. Les paramètres rhéologiques ont été mesurés en suivant la méthode décrite en section II.6.1.

L'opération de moussage a été effectuée dans un robot ménager (Kenwood KM262, figure II.11). Ce dispositif est constitué d'une cuve en acier inoxydable de volume 4,2 L munie d'un système d'agitation planétaire dont la vitesse de rotation a six positions de 1 à 6. L'expérience consiste à placer la préparation dans la cuve sous une vitesse d'agitation

constante qui assure l'aspiration de l'air du ciel du récipient pour des durées de mélange variables, de 5, 10, 15 et 20min.

Les mousses obtenues en discontinue ont été caractérisées par leur taux de foisonnement et le diamètre moyen des bulles. Le taux de foisonnement (Φ) d'une mousse, qui représente le volume de gaz incorporé divisé par volume de liquide initial, peut être calculé par la relation suivante :

$$\Phi = \frac{\rho_c - \rho_m}{\rho_m} \times 100 \quad (\text{II-9})$$

Dans cette relation, ρ_c et ρ_m correspondent respectivement à la masse volumique de la phase continue et de la mousse. Les masses volumiques ont été déterminées par simple empotage manuel : un récipient de volume connu (25 mL) est rempli et arasé, puis pesé ; on détermine ainsi de la même façon la masse de la matière première et celle de la mousse. La masse volumique est alors connue de façon immédiate. Ces mesures ont été effectuées trois fois pour minimiser l'erreur sur le prélèvement et permettre une analyse statistique. Les distributions des tailles des bulles ont été déterminées avec la même méthode que celle décrite en section II.6.2.



Figure II.11 : Robot-ménager (Kenwood KM262) utilisé pour le foisonnement en batch

II.7.2 Foisonnement en continu (colonne de foisonnement)

Pour l'étude de l'aptitude du PCPB à foisonnement en continu, nous avons utilisé une formulation (Fa) dont la composition est la même que celle utilisée par Thakur (2003), excepté le fait que les protéines de lait ont été remplacées par le PCPB. Ensuite, en se basant sur les résultats obtenus lors du foisonnement de cette formulation, nous avons procédé à des modifications successives de la formulation initiale pour une mise en œuvre plus efficace de l'opération de foisonnement en continu.

Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, les expériences ont été réalisées sur une installation de laboratoire appelée « colonne de foisonnement » et notée CF (figure II.12a). Il s'agit d'une colonne en acier inoxydable constituée de trois étages de 141 mm de hauteur et de 35 mm de diamètre intérieur montés en série. Chaque étage est muni d'une double enveloppe dans laquelle circule de l'eau de refroidissement.

La dispersion du gaz dans la phase continue est réalisée par une agitation mécanique à l'aide d'un axe muni de trois éléments à quatre pales droites de 33 mm de diamètre et de 65 mm de hauteur (figure II.12b). L'axe des agitateurs est relié à un moteur IK LaborTechnik RE-16 (Ikavisc, Allemagne) dont la vitesse de rotation peut être contrôlée entre 10 et 1600 tpm et qui est équipé d'une jauge de contrainte IK MR-D1 (Ikavisc, Allemagne) permettant la mesure du couple résistant sur l'axe. La formulation à foisonner est introduite dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique. Le gaz est également introduit en pied de la colonne à travers un fritté métallique ayant des pores de diamètre moyen égal à 20 μm . Son débit est imposé à l'aide d'un débitmètre massique (Emerson Brooks, 0-100 mL/min).

La mousse à la sortie de CF a été caractérisée en termes de taux de foisonnement et de distribution des tailles de bulles, en utilisant les mêmes outils que ceux décrits précédemment dans la section II.7.1 et II.6.2.

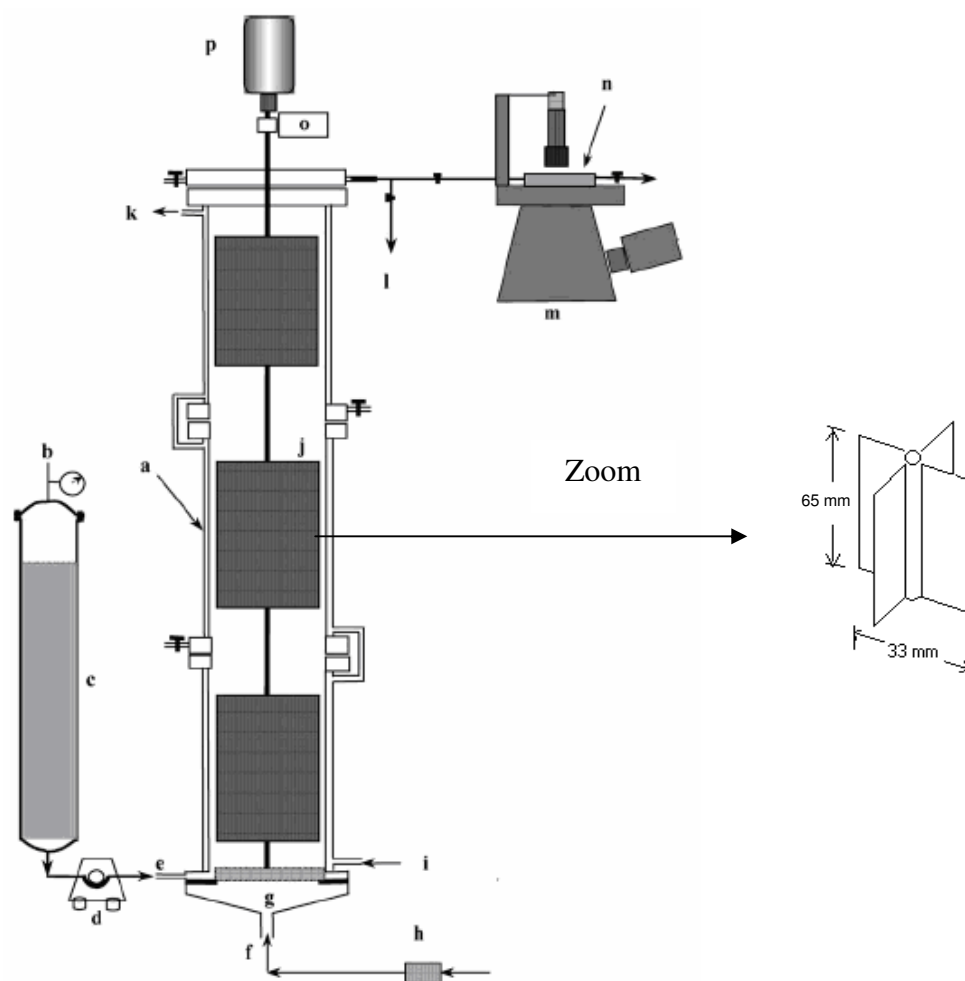


Figure II.12 : Schéma de la colonne de foisonnement : (a) double enveloppe, (b) air comprimé, (c) réservoir, (d) pompe péristaltique, (e) entrée du liquide, (f) entrée du gaz, (g) fritté, (h) débitmètre massique, (i) entrée de liquide de refroidissement, (j) agitateur, (k) sortie du liquide de refroidissement, (l) sortie de la mousse, (m) microscope optique relié à une caméra, (n) cellule de visualisation, (o) couplemètre, (p) moteur.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Première Partie

Étude de la Valorisation de la VSM

Résultats et Discussion

1ère Partie

Chapitre III

Étude de la Valorisation de la VSM

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, deux types de coproduits ont fait l'objet d'étude dans le cadre de notre travail. Il s'agit d'une part de la VSM (viande séparée mécaniquement) de têtes de poulets, et d'autre part du poumon de bœuf. Ces coproduits ont été choisis en concertation avec l'ADIV en réponse à une demande de la filière des abattoirs en France.

Les compositions moyennes initiales en matières sèches (MS), protéines récupérables, collagène et lipides de la VSM et de poumon de bœuf sont résumées dans le tableau III.1. Le terme « protéines récupérables » représente les protéines totales diminuées de la quantité en collagène. En effet, les conditions d'extraction choisies dans ce travail ne sont pas capables d'extraire le collagène, parce que, même si la gélatine peut être extraite du collagène par chauffage, ce traitement va dénaturer irréversiblement tous les autres types des protéines et ainsi provoquer la perte de leurs fonctionnalités. Le tableau montre que la VSM contient une quantité bien moins importante de protéines récupérables que le poumon de bœuf ; elle est également la plus riche en lipides, ce qui peut impacter négativement l'étape de la solubilisation. Le rapport protéines/MS de la VSM (43,9%) est donc beaucoup moins élevé que celui du poumon de bœuf (64,1%). Plus généralement, le poumon de bœuf est un coproduit très intéressant en termes de protéines récupérables, mais également parce qu'il présente un rapport protéines/matière grasse très élevé (4,8%), bien que sa teneur en collagène (i.e. de protéines non-récupérable) soit plus élevée que celle de la VSM.

L'objectif de cette partie est de résumer les principaux résultats concernant l'extraction et la concentration des protéines de la VSM de poulet. Nous présenterons tout d'abord l'influence des conditions opératoires comme le pH, la température et la durée d'extraction sur le rendement de solubilisation des protéines. Ensuite, nous décrirons les résultats obtenus lors des essais de concentration et de purification de ces protéines solubilisées. Il s'agira de

présenter les résultats de la concentration par procédé membranaire, puis, les résultats obtenus par précipitation au point isoélectrique des protéines.

Le deuxième objectif de cette partie sera dédié aux propriétés fonctionnelles des protéines extraites ; il s'agit d'étudier leurs propriétés gélifiante, émulsifiante et moussante. Afin de positionner ces protéines parmi les autres ingrédients commerciaux, ces fonctionnalités ont été comparées à celles des protéines commerciales de référence, telles que les caséinates de sodium (Na-CN), les protéines de lactosérum, les isolats de soja, les protéines de blanc d'œuf ou encore de plasma de bœuf (tableau II.1).

Tableau III.1 : Composition moyenne des coproduits en % massique

Composition	VSM de poulet	Poumon de bœuf
Matières sèches (MS) %	20,7±0,2	21,5±0,5
Protéines récupérables %	9,1±0,5	13,8±0,3
Collagène %	1,8±0,2	4,1±0,3
Lipides %	8,8±0,2	2,9±0,2
Protéines/MS %	43,9	64,1
Lipides/MS %	42,5	13,4
Protéines/lipides	1,03	4,8

III.1 Extraction des protéines de la VSM

III.1.1 Étape de solubilisation des protéines

La solubilisation est la première étape dans le processus d'extraction des protéines d'un coproduit. Elle a pour but de transférer l'essentiel des protéines de ce coproduit vers une phase aqueuse choisie de façon à favoriser la solubilisation. Cette opération a donc une importance capitale par rapport aux critères économiques puisqu'elle conditionne fortement le rendement de la récupération protéique. Le but est donc de déterminer le meilleur compromis en termes de conditions opératoires pour la solubilisation des protéines. Parmi les paramètres qui jouent un rôle sur cette étape, nous avons choisi d'étudier le pH, la température et la durée d'extraction. Notons que l'effet du rapport massique coproduit/solution a déjà fait l'objet du master de Masselot (2005), réalisé au sein du LGCB. Pour cette étude, Masselot (2005) avait utilisé différents rapports massique coproduit/eau lors de l'extraction des protéines de cœurs

de volailles. Elle a démontré que le meilleur rendement protéique obtenu pour la solubilisation des protéines de cœurs de volailles, environ 80%, avait été atteint pour 20% (p/p) de rapport massique cœur de volaille/eau. Elle a par la suite utilisé cette valeur pour d'autres coproduits qui, bien que pas nécessairement optimale, assure en général un rendement d'extraction et une productivité toutes deux suffisantes pour pouvoir mettre en œuvre les opérations de concentration et de purification des protéines. C'est également ce rapport massique de 20% (p/p) coproduit/eau que nous retiendrons dans ce travail pour l'extraction des protéines de la VSM.

III.1.1.1 Effet du pH

L'effet du pH sur le rendement de la solubilisation des protéines de la VSM a été étudié entre 4 et 9, c'est-à-dire dans des conditions qui recouvrent les milieux légèrement acides, neutres et légèrement basiques. Nous avons volontairement limité le domaine de la variation de pH, car à des pH plus élevés que 9 ou plus faibles que 4, la majorité des protéines sont dénaturées sous l'effet du pH d'après Cheftel (1985). En effet, aux pH extrêmes, de fortes répulsions électrostatiques ont lieu entre les groupes ionisés au sein des protéines, ce qui favorise le déplissement (i.e. la dénaturation) de ces macromolécules.

Les rendements de la solubilisation protéique en fonction de pH ont été calculés en divisant la quantité de protéines récupérées dans le surnageant par celle de protéines dans le produit initial. Les valeurs expérimentales sont présentées sur la figure III.1. Les résultats montrent que le rendement de la solubilisation augmente quand le pH augmente : ainsi, il passe de 30% à environ 68% lorsque le pH varie de 4 à 9. Il semble donc que plus on s'approche des pH acide, plus la précipitation des protéines est favorisée, du moins jusqu'à pH 4. Par ailleurs, il est également possible que la présence des lipides dans la VSM (8,8% p/p) conduise à une réduction du rendement de la solubilisation des protéines en raison de la formation d'une émulsion pendant l'étape de solubilisation (Yada, 2004), une partie des protéines étant alors adsorbée aux interfaces eau/matière grasse. Nous avons donc décidé d'effectuer une étape de prétraitement supplémentaire afin d'extraire les lipides de la matière initiale, avant même d'extraire les protéines.

L'extraction des lipides a été réalisée en utilisant un solvant organique apolaire, l'hexane, dans un rapport massique de 1/5 (VSM/hexane) pendant 1 heure à température ambiante. Cependant cette méthode n'a pas été efficace dans le cas de la VSM car, après le traitement avec le solvant, le rendement de la solubilisation des protéines a fortement chuté

(12% p/p). Cela peut être dû à la perte des protéines présentant une forte affinité avec la matière grasse dans le solvant organique : autrement dit, une partie des protéines de la VSM pourrait se retrouver avec la matière grasse extraite. Une autre explication serait liée à l'effet dénaturant du solvant organique sur les protéines, celles-ci devenant alors insolubles suite à la dénaturation. En effet, les solvants organiques peuvent être considérés comme des agents dénaturants parce qu'ils modifient la constante diélectrique du milieu et, par conséquent, les forces électrostatiques qui contribuent à la stabilité des protéines (Cheftel, 1985).

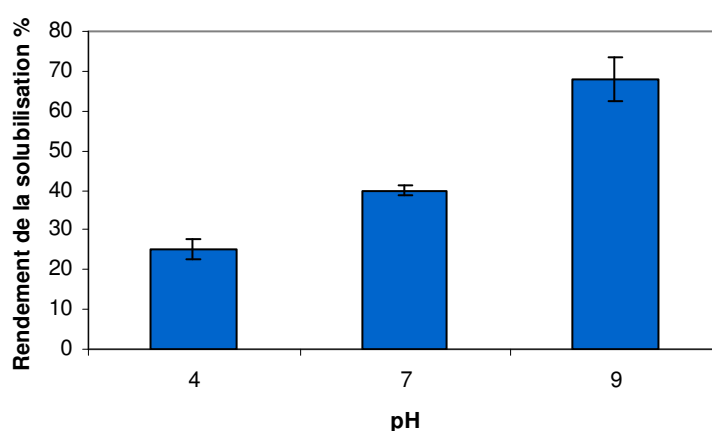


Figure III.1 : Effet du pH sur la solubilisation des protéines de la VSM.

Pour vérifier la présence de protéines avec la matière grasse extraite, nous avons effectué une étude du comportement thermique de la matière grasse extraite à l'hexane de la VSM par DSC (TA Instruments, DSC Q100). La figure III.2 présente les thermogrammes correspondant respectivement à la fusion et à la cristallisation de la matière grasse à une vitesse de 2°C/min entre -40 et 80°C. Lors de la fusion, on remarque la présence de trois groupes de pics endothermiques. Le premier, entre -20°C et -10°C, peut être attribué à la fusion de la matière grasse ; le deuxième (vers 0°C) correspond vraisemblablement à la fusion de l'eau résiduelle, et le troisième (vers 45°C) est probablement lié à la dénaturation thermique des protéines extraites avec la matière grasse, bien qu'il contienne sans aucun doute aussi une contribution due à la fusion de la matière grasse au-dessous de 40°C. En effet, la courbe de cristallisation de matière grasse (figure III.3) montre clairement une quasi-disparition du troisième pic qui ne peut être attribuée uniquement à la surfusion des lipides, ce qui permet de confirmer la présence de protéines. En conséquence, l'étape de solubilisation des protéines a été effectuée à pH 9 sans extraction préalable des lipides de la VSM.

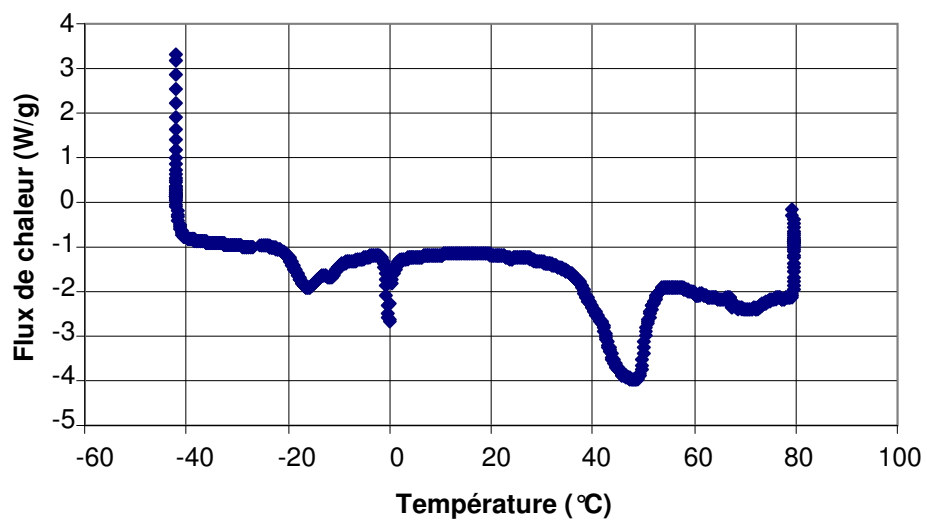


Figure III.2 : Analyse DSC en fusion de la matière grasse extraite de la VSM.

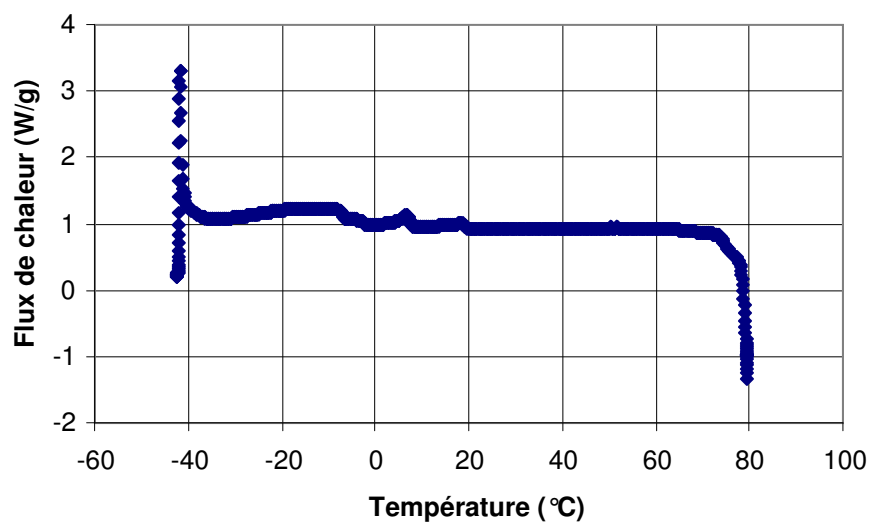


Figure III.3 : Analyse DSC en cristallisation de la matière grasse extraite de la VSM.

III.1.1.2 Effets de la durée d'extraction et de la température

Pour étudier les effets respectifs de la durée d'extraction et de la température sur le rendement de solubilisation des protéines, nous avons utilisé des solutions protéiques présentant un rapport VSM/eau de 20% (p/p) à pH 9. L'effet de la température a été étudié à 20°C, 30°C et 40°C et celui de la durée d'extraction à 30 et 60 minutes. Les résultats concernant l'effet de la température sur la solubilisation des protéines pour les deux durées d'extraction sont présentés dans le tableau III.2, chaque valeur reportée dans le tableau correspondant à la moyenne de trois essais. Concernant la température, on remarque que l'amélioration du rendement protéique apparaît seulement lorsque la température est 40°C. En effet, à cette température, le rendement protéique augmente, quelle que soit la durée d'extraction. L'amélioration du rendement à 40°C peut être attribuée à la fusion des matières grasses à cette température qui favoriserait la solubilisation des protéines. Notons que pour éviter la dénaturation des protéines, nous n'avons pas étudié l'extraction à une température supérieure à 40°C. Concernant la durée d'extraction, l'écart reste dans le domaine de l'erreur expérimentale, bien qu'il soit presque significatif pour 40°C. Pour cette raison, nous préférons la durée d'extraction la plus élevée avec la température la plus élevée.

Tableau III.2: Effet de la température sur la solubilisation des protéines de VSM.

Température (°C)	20	30	40
Rendement protéique %*	71±3	71±2	77±3
Rendement protéique %**	68±4	67±4	83±7

*30 min ; **60 min.

En conclusion, on retiendra que les meilleures conditions opératoires pour la solubilisation des protéines de la VSM de poulet sont : pH 9, une température de 40°C et une durée d'extraction de 60 min. Maintenant les protéines solubilisées, nous allons chercher à concentrer les solutions (surnageants) afin d'obtenir des concentrats protéiques (>60% de protéines dans la matière sèche) et pouvoir étudier leurs propriétés fonctionnelles.

III.1.2 Étape de concentration des protéines

L'objectif de cette partie est de purifier et de concentrer les solutions de protéines après l'étape de solubilisation. On cherche donc à concentrer la solution, à la fois en éliminant l'eau et en réduisant la quantité de matières grasses dans la solution. Pour la VSM, nous avons

utilisé deux méthodes : la première consiste à utiliser des techniques membranaires, alors que la seconde consiste à faire précipiter les protéines solubilisées à leur pI.

III.1.2.1 Concentration par technique membranaire

Pour concentrer les protéines, nous avons effectué une microfiltration (MF) en utilisant des membranes avec un seuil de coupure de 1,4 μm . le choix de la taille des pores de la membrane a été optimisée par Masselot (2005) dans le cadre de son stage de master au sein du LGCB. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de la température à 20°C et à 30°C, sous une pression de 1 bar (figure III.4). D'après cette figure, le débit de perméat est identique à l'erreur expérimentale près pour les deux températures étudiées. Quelle que soit la température, ce débit est d'environ 120 L/(h.m²) au début de l'opération et d'environ 20 L/(h.m²) après 340 min de filtration. On note également que la diminution du débit de perméat débute immédiatement et se produit pour l'essentiel dans les 15 premières minutes après le début de l'opération de filtration. Cette diminution pourrait être due à un effet de colmatage de la membrane résultant de la présence de lipides dans le surnageant. En effet, une fraction des lipides peut se lier aux protéines pendant l'étape de la solubilisation, sachant que les lipides représentent environ la moitié de la matière sèche dans le surnageant (tableau III.3). Le colmatage de la membrane par la matière grasse semble donc a priori le principal responsable de la diminution du débit de perméat.

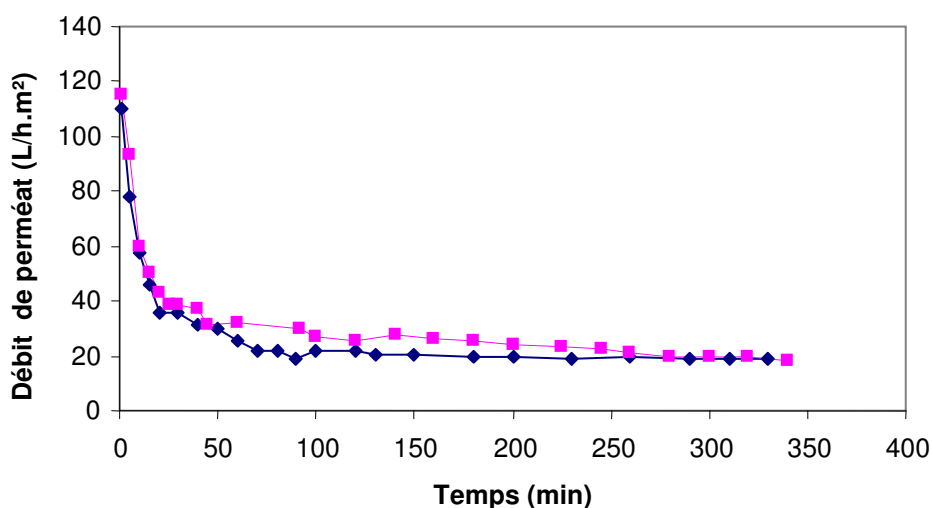


Figure III.4 : Effet de la température sur le débit de perméat à : ■ à 30°C et ♦ 20°C.

Tableau III.3 : Composition des concentrés protéiques issus des étapes d'extraction.

Composition (% p/p)	Surnageant de l'étape de la solubilisation	Protéines après l'étape de précipitation	Concentrés protéiques après extraction des lipides
Protéines/MS	44,7	45,2	83
Lipides/MS	50,2	50,8	13
Rendement protéique	83,6	74	55

Pour améliorer le débit du perméat, nous avons augmenté la pression transmembranaire de 1 à 2 bars (figure III.5). On constate qu'il n'y a pas d'amélioration très significative du débit qui reste entre 100 et 120 L/(h.m²) au début de l'opération et qui suit la même tendance que sous une pression de 1 bar, ce qui confirme l'hypothèse d'un colmatage par les lipides. Par ailleurs, le rendement protéique obtenu dans le perméat reste compris entre 15% et 20% ; autrement dit, la grande majorité des protéines ne passe pas dans le perméat : elles restent donc dans le rétentat avec les matières grasses. Il semble donc que la concentration par microfiltration est peu adaptée au cas des protéines de la VSM alors que la membrane de MF (diamètre moyen des pores de 1,4 µm) ne devait pas être un obstacle pour les protéines. Nous avons donc décidé d'utiliser une méthode alternative : il s'agit de la précipitation des protéines à leur point isoélectrique moyen, c'est-à-dire au pI de la majorité des protéines de la VSM. Notons que cette méthode a déjà été largement utilisée dans la littérature pour l'extraction des protéines des coproduits animaux (Ledward et Gault, 1985).

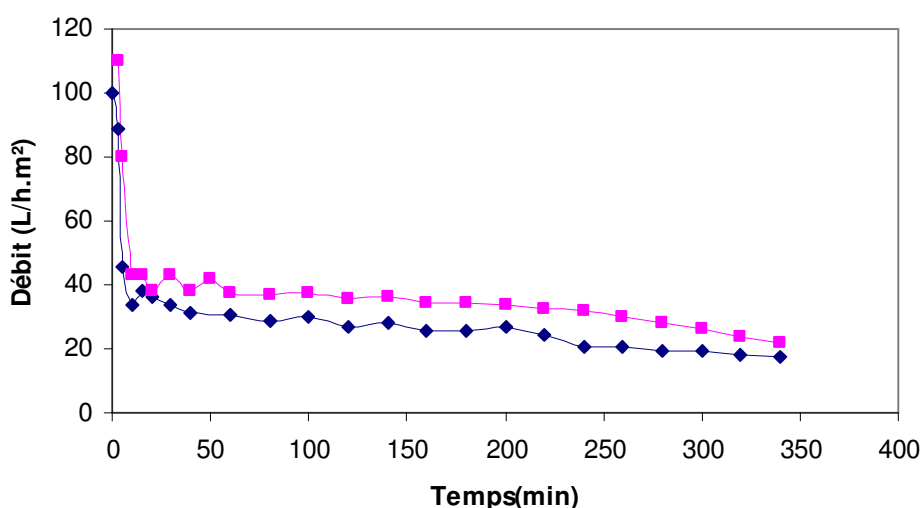


Figure III.5 : Effet de la pression transmembranaire sur le débit de perméat à 30°C: ◆ 1 bar et
 ■ 2 bars.

III.1.2.2 Concentration par précipitation au point isoélectrique

Les protéines solubles de la VSM dans le surnageant de la solubilisation ont été soumises à une précipitation en milieu acide, à pH 4, en utilisant une solution de HCl à 37% massique. Ce pH a été choisi sur la base des résultats obtenus précédemment (figure III.1), qui ont montré qu'à pH 4, la solubilité des protéines était la plus faible dans la gamme 4-9. Les protéines précipitées ont été ensuite récupérées par centrifugation. Les rapports protéines/matière sèche et lipides/matière sèche dans la phase précipitée, ainsi que le rendement de récupération protéique sont présentés dans le tableau III.3 (colonne 3). On constate alors que l'étape de précipitation conduit à une perte en protéines qui se traduit par une diminution du rendement de récupération (74%). Il semble en fait que la VSM contienne plusieurs fractions protéiques, avec un large spectre de pI. Le tableau III.3 montre également que la matière grasse représente près de la moitié de la matière sèche récupérée dans la phase précipitée, comme si la matière grasse précipitait avec les protéines. Ainsi, afin d'éliminer la matière grasse, nous avons décidé de réaliser un traitement d'extraction des matières grasses dans le précipité par un mélange de solvants organiques (hexane et isopropanol) selon le protocole décrit dans la section II.3. La composition finale des concentrés protéiques de la VSM après traitement avec le solvant organique est reportée dans le tableau III.3 (colonne 4). On constate que, malgré une perte protéique due au traitement avec le solvant, le taux de protéines dans la matière sèche du précipité final est voisin de 83%, c'est-à-dire qu'il est deux fois plus élevé que dans la VSM où il avoisine les 43%. (Tableau III.1).

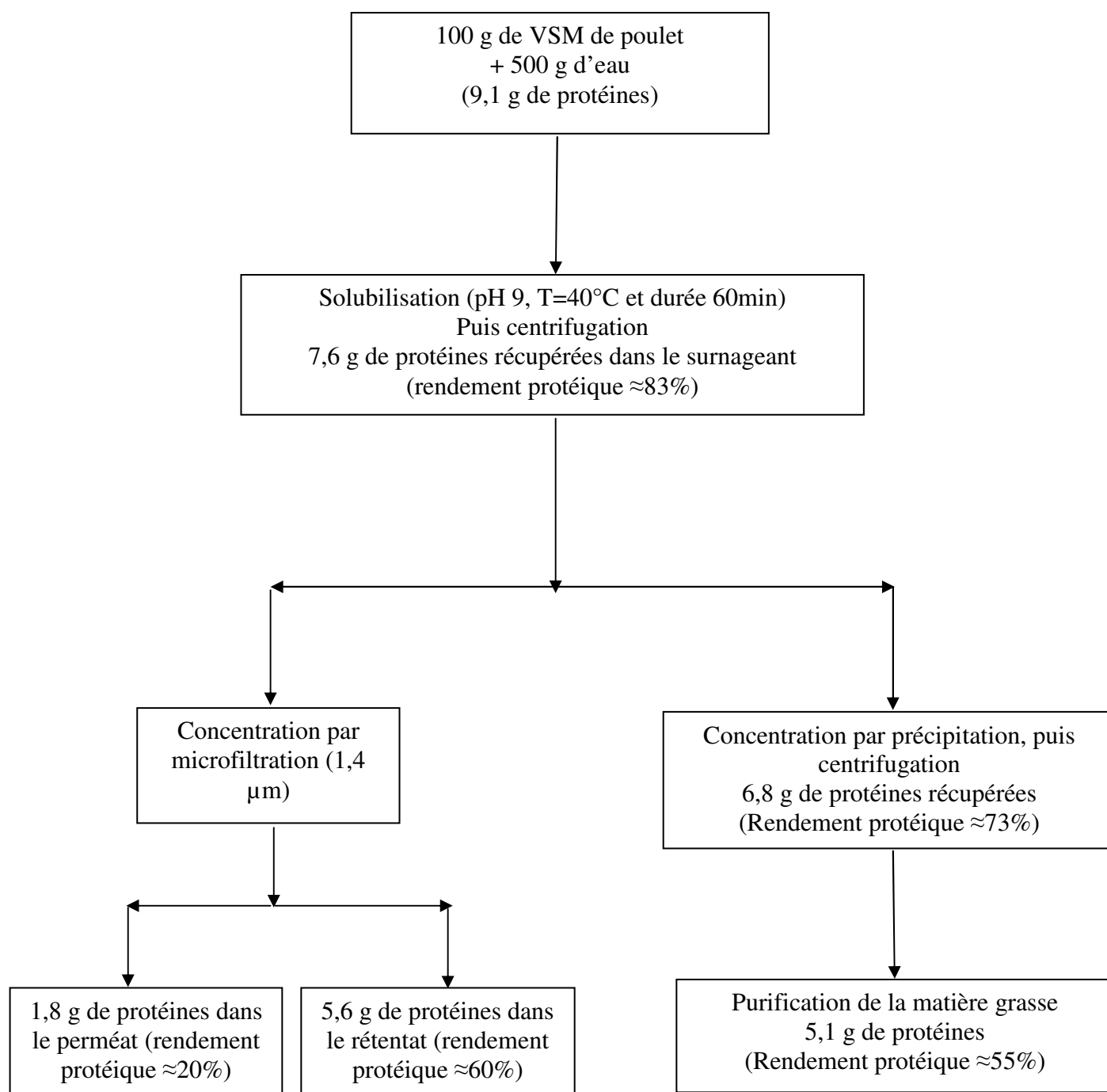


Figure IV.6 : Bilan global du fractionnement des protéines sur une base de 100 g de VSM

En conclusion, nos résultats montrent que l'extraction des protéines de la VSM est possible en utilisant des méthodes « douces ». Le schéma suivant (figure III.6) résume les étapes que nous avons utilisées pour l'extraction des protéines sur une base de 100 g de VSM. On constate que, en utilisant la microfiltration pour la concentration des protéines de VSM, le rendement protéique total est compris entre 15-20% p/p dans le perméat, alors qu'il est proche de 60% dans le rétentat. Par précipitation au pI, ce rendement atteint 73% p/p avant élimination de la matière grasse et il chute à 55% p/p après l'extraction des lipides.

Sur la base de ce dernier résultat, il semble maintenant important d'étudier comment la présence de matière grasse dans les concentrés protéiques affecte les fonctionnalités des protéines qu'ils contiennent. En effet, la perte protéique due à l'élimination de la matière grasse ne peut être justifiée d'un point de vue économique que si elle apporte un gain en termes de fonctionnalités. Aussi, pour le procédé membranaire, on retiendra que compte tenu de la faible quantité de protéines récupérée dans le perméat, nous avons décidé de n'étudier dans la section suivante que les propriétés fonctionnelles des protéines récupérées dans les rétentats issus de l'opération de microfiltration.

III.2 Propriétés fonctionnelles des protéines extraites de la VSM

L'étude des propriétés fonctionnelles des protéines de la VSM issues des rétentats de l'étape de MF et des concentrés obtenus par précipitation au pI avant et après extraction de la matière grasse fera l'objet de la suite de notre travail. Nous avons également effectué une étude comparative par rapport aux ingrédients protéiques commerciaux présentés dans le tableau II.2, le but étant de positionner les protéines issues de la VSM parmi les principales familles de protéines commerciales (lait, œuf, plasma et protéines végétales) qui sont utilisées comme agent émulsifiant (caséinates de sodium et isolat de soja), agent moussant (isolates de protéines de lactosérum et de protéines de blanc d'œuf) et agent gélifiant (protéines de plasma de bœuf).

III.2.1 Propriétés gélifiantes

Dans un premier temps, nous avons déterminé la température de gélification et la force de gel pour des solutions protéiques à 2% (p/p) contenant des ingrédients commerciaux. Pour chaque ingrédient, la variation du module élastique en cisaillement G' en fonction de la température est illustrée par la figure III.7. On constate que la température de gélification est d'environ 60°C pour le plasma et de 70°C pour le blanc d'œuf. Inversement, les caséinates de

sodium qui sont des protéines linéaires présentant peu de structures tertiaire et quaternaire ne sont pas dénaturés dans la gamme de température étudiée et, par conséquent, ne présentent pas de capacité de gélification, comme attendu. Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs fournies par l'Institut Français pour la Nutrition (1997). Par ailleurs, cette figure montre que quel que soit l'ingrédient, le module élastique reste toujours inférieur à 17000 Pa, même pour le plasma de bœuf qui est connu pour son fort pouvoir gélifiant.

En ce qui concerne la VSM, la figure III.8 présente l'évolution du module élastique G' en fonction de la température pour les solutions protéiques à 2% (p/p) issues des rétentats de MF et celles obtenues par précipitation au pI avant et après l'extraction des lipides. Cette figure montre que pour les protéines de VSM issues de MF, la température de gélification est proche de celle du plasma (60°C) avec une force de gel plus élevée (40000 Pa). La température de gélification des protéines précipitées avant l'extraction de la matière grasse reste proche de celle du plasma (65°C), et le module d'élasticité G' présente une force de gel qui atteint à 45000 Pa, soit des valeurs beaucoup plus élevées que celles des protéines de plasma. On notera également que l'élimination des matières grasses a un impact négatif sur les propriétés gélifiantes des protéines de VSM, à la fois sur la température de gélification et sur la force de gel. Les protéines de VSM après l'extraction de la matière grasses se gélifient vers 70°C et leur force de gel n'atteint que 10000 Pa. Il semble donc que les protéines éliminées lors de l'extraction des lipides par le mélange hexane/isopropanol, bien qu'en faible en quantité (tableau III.3), contribuent fortement aux propriétés gélifiantes.

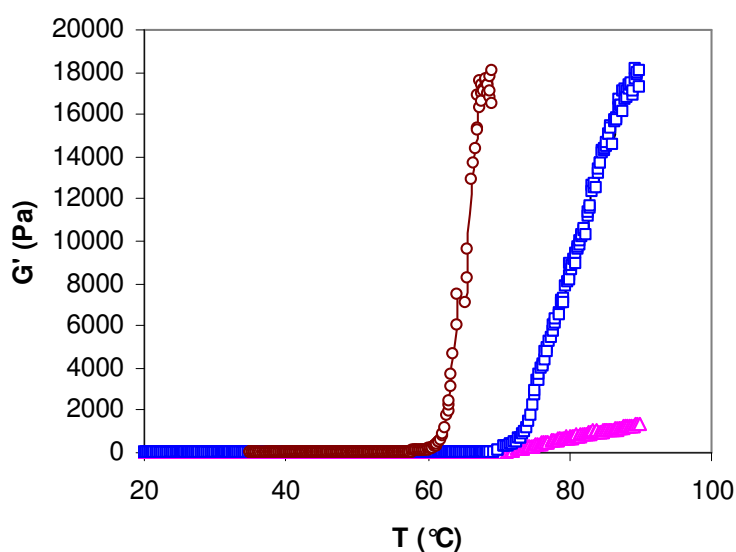


Figure III.7 : Évolution du module élastique en fonction de la température pour les protéines commerciales : (○) plasma de bœuf, (□) protéines de blanc d'œuf et (△) Na-CN.

En conclusion, on retiendra tout d'abord que les protéines de la VSM ont une force de gel plus élevée que les protéines de plasma de bœuf qui sont considérées comme un des meilleurs agents gélifiants dans les applications alimentaires. On retiendra également que les propriétés fonctionnelles sont fortement dépendantes des traitements appliqués. Ainsi, le rendement de récupération protéique ne constitue pas le seul paramètre à optimiser pour valoriser ces protéines, mais il faut également tenir compte de l'évolution des fonctionnalités des protéines en fonction des traitements appliqués.

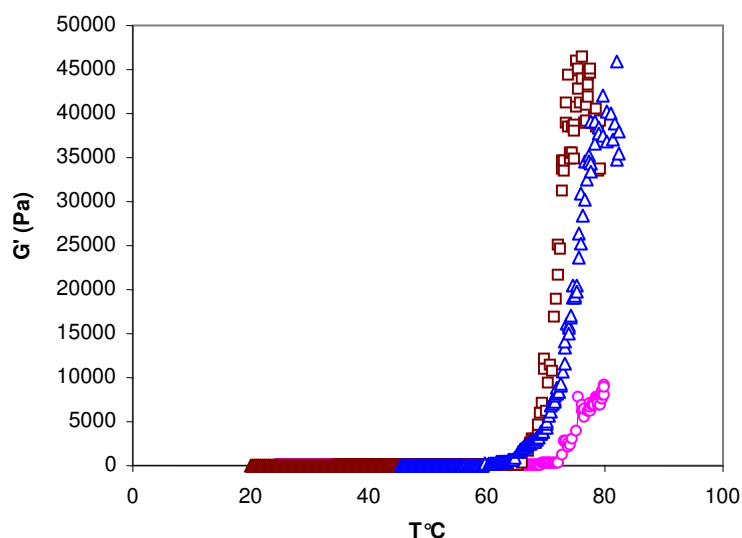


Figure III.8 : Évolution du module élastique en fonction de la température pour les protéines de la VSM issues de la précipitation avant l'extraction des lipides (□), après l'extraction des lipides (○) et pour les protéines issues de rétentats de MF (△).

III.2.2 Propriétés moussantes

Le pouvoir moussant (FA) a été calculé à l'aide de l'équation II.2. Dans le tableau III.4, nous avons comparé les valeurs du pouvoir moussant (FA) et de la stabilité moussante (FS), obtenues respectivement pour les protéines extraites de VSM et les ingrédients commerciaux. D'après ce tableau, on peut noter que les protéines de la VSM précipitées au pI avant extraction des lipides présentent un FA meilleur que les ingrédients commerciaux, à l'exception des protéines de lactosérum. Après extraction des lipides, le pouvoir moussant des protéines de VSM diminue de près de moitié par rapport à celui avant la purification, ce qui est en accord avec les résultats sur les propriétés gélifiantes de la section III.3.1. De même, les protéines obtenues par MF ont un FA inférieur à celles obtenues par précipitation avant

extraction des lipides, mais qui est cette fois similaire au FA des protéines obtenues après extraction de ces mêmes lipides.

Tableau III.4 : Comparaison des pouvoirs moussants et des stabilités moussantes des protéines commerciales et des protéines de VSM.

Type de Protéine	FA (%)	FS (min)
VSM issue de MF	40±5	210±6
VSM avant extraction des lipides	65±2	180±3
VSM après extraction des lipides	35±3	30±5
Protéines sériques du lait	74±2	61±3
Blanc d'œuf	42±3	237±4
Isolat de soja	18±3	60±2
Na-caséinates	45±3	19±4

La stabilité moussante présente cependant une image bien différente. Les protéines du blanc d'œuf présentent la plus haute stabilité moussante, comme attendu, ce qui justifie leur large utilisation comme agent moussant dans l'industrie alimentaire. Les concentrés protéiques de VSM issus de MF et ou de la précipitation au pI avant extraction des lipides présentent des valeurs très élevées de stabilité moussante, bien supérieures à tous les ingrédients commerciaux sauf le blanc d'œuf, et elles restent assez proches de celles du blanc d'œuf pour être susceptibles de le concurrencer comme ingrédient fonctionnel. En revanche, après extraction de la matière grasse, la stabilité moussante chute fortement. Ce résultat semble surprenant en raison de la forte teneur en matières grasses de ces deux concentrés. En effet, les matières grasses, et en particulier les fractions les plus solubles de matières grasses (telles que les mono- et diglycérides d'acides gras), sont connues pour être des dépresseurs de mousses car elles sont capables de rentrer en compétition avec les protéines à l'interface air-eau et même de déplacer les protéines de la couche adsorbée (Dickinson et Stainsby, 1982). Dans le cas présent, il est cependant possible que ce comportement soit masqué par la forte activité de surface de ces protéines. En effet, les protéines présentant la plus forte affinité avec la matière grasse sont également celles qui ont vraisemblablement la plus forte affinité avec les interfaces eau-air et il est également possible que ces protéines s'adsorbent avec leur

matière grasse associée, comme le font les globules gras couverts de protéines via la couche adsorbée dans les produits laitiers.

En conclusion, on retiendra que les protéines extraites de la VSM avant extraction des lipides présentent des propriétés moussantes très intéressantes. Elles pourraient donc éventuellement remplacer les protéines de lactosérum ou celles de blanc d'œuf dans certaines préparations de produits aérés, comme par exemple certaines mousses de foie de volailles et de légumes. En revanche, l'élimination de la matière grasse s'est traduite par un effet négatif sur ces propriétés, en particulier sur la stabilité moussante, ce qui confirme une fois encore que la pureté des protéines ne correspond pas toujours à de bonnes propriétés fonctionnelles.

III.2.3 Propriétés émulsifiantes

L'activité et la stabilité émulsifiante ont été calculées respectivement à partir des équations II.3 et II.5. Le tableau III.5 illustre les résultats expérimentaux obtenus ; il résume à la fois les valeurs de EA et de ES estimées pour les protéines commerciales de référence et pour les protéines de la VSM, qu'elles aient été obtenues par MF ou par la méthode de précipitation, avant ou après l'extraction des lipides. Ce tableau montre que parmi les ingrédients commerciaux, les caséinates de sodium sont les meilleurs agents émulsifiants en termes d'activité émulsifiante, et que l'isolat de soja présente la meilleure stabilité émulsifiante, comme attendu. Les écarts entre les valeurs de EA restent cependant assez faibles entre les principaux agents émulsifiants lorsqu'on les compare aux incertitudes expérimentales. Les protéines de VSM issues de MF ont montré une activité émulsifiante plus importante que celles obtenues par précipitation avant extraction des lipides ; en revanche, les protéines de VSM purifiées des matières grasses présentent des activités émulsifiantes supérieures à tous les autres ingrédients mentionnés dans le tableau III.5, ce qui confirme la très grande affinité des protéines de la VSM pour les lipides. Il faut donc souligner que, contrairement aux comportements observés pour la gélification et le pouvoir moussant, l'extraction des lipides améliore les propriétés émulsifiantes de la VSM. Cela est sans doute dû au fait que l'extraction des lipides libère des protéines très lipophiles et leur permet de s'adsorber aux nouvelles interfaces H/E en présence d'huile de soja.

En ce qui concerne la stabilité émulsifiante (ES), quel que soit le mode d'extraction, MF, ou bien précipitation isoélectrique avant et après l'élimination des matières grasses, les protéines de VSM présentent une stabilité émulsifiante (ES) assez faible, notamment plus faible que certains émulsifiants commerciaux de référence (isolats de soja), mais similaire aux

caséinates de sodium. Un tel comportement n'est pas totalement surprenant : la faible valeur de la stabilité émulsifiante des meilleurs agents émulsifiants, la VSM après extraction des lipides et les caséinates de sodium, est due à leur activité émulsifiante élevée qui conduit à une création d'interface H/E importante, et par voie de conséquence, favorise plus fortement la recoalescence des gouttelettes au cours du temps. Une exception à cette règle est l'isolat de soja qui est connu pour être capable de stabiliser les émulsions concentrées, contrairement aux caséinates de sodium.

Tableau III.5 : Comparaison des activités et stabilités émulsifiantes des protéines commerciales et de celles de la VSM

Types de protéines	EA	ES (min)
VSM, issu de MF	0,50±0,1	17±3
VSM avant extraction des lipides	0,40±0,08	17±2
VSM après extraction des lipides	0,75±0,06	15±4
Protéines sériques	0,42±0,02	33±2
Blanc d'œuf	0,51±0,06	18±3
Isolat de soja	0,48±0,04	17±2
Caséinates de sodium	0,56±0,04	15±2

III.3 Conclusions

En conclusion de ce chapitre, nous rappellerons que nous avons comparé différentes méthodes d'extraction des protéines de la VSM de têtes de poulet destinées à maintenir leurs propriétés fonctionnelles une fois extraites. La VSM est un coproduit riche en lipides qui rend l'extraction et la purification des protéines difficiles. La procédure consiste d'abord à solubiliser les protéines dans des solutions aqueuses, à pH 9 et à 40°C pendant 60 min sous agitation mécanique. Cette méthode est facile à mettre en œuvre et conduit à un bon rendement de récupération protéique (83±7 %p/p).

Deux méthodes de concentration et de purification ont été proposées. La première consiste à utiliser la microfiltration sur membrane céramique présentant des pores de 1,4 µm ; toutefois, cette technique ne s'est pas révélée efficace à cause de la présence d'une quantité importante de matières grasses dans la VSM. En effet, la présence de lipides réduit considérablement l'efficacité de séparation des membranes de MF : le rendement protéique de

récupération dans le perméat n'est que de 15-20%, probablement à cause du colmatage de la membrane. La deuxième technique a consisté à faire précipiter les protéines solubilisées à leur point isoélectrique (pH 4). Cette méthode, également facile à mettre en œuvre, reste aussi moins coûteuse que les techniques membranaires. Les protéines précipitées ont ensuite fait l'objet d'un traitement avec un solvant organique afin d'éliminer la matière grasse. Le rendement global de la récupération protéique a alors chuté de 73% à 55% (p/p).

L'étude des propriétés fonctionnelles des protéines du rétentat de la MF et de celles obtenues par précipitation au pI avant et après l'extraction des lipides a confirmé que ces protéines présentent d'excellentes propriétés fonctionnelles qui, en général, ne sont pas altérées par les méthodes d'extraction. Dans certains cas, elles présentent des fonctionnalités plus élevées que celles des ingrédients commerciaux. Par exemple, avant l'extraction des lipides, elles ont un bon pouvoir gélifiant, plus élevé que le plasma de bœuf et que les protéines du blanc d'œuf : elles gélifient à relativement faible température (environ 60°C) et présentent une forte force de gel qui peut atteindre 45000 Pa, ce qui les rend attractives comme agent de rétention d'eau dans des produits élaborés à base de viande.

Les protéines de la VSM ont également montré de bonnes propriétés moussantes, même si le nombre d'applications de ces propriétés est plus restreint dans le secteur des produits carnés. On notera que dans ces deux cas, l'élimination des lipides a un effet négatif sur la formation du gel et donc sur le pouvoir de rétention d'eau, ainsi que sur le pouvoir moussant. En revanche, l'extraction des matières grasses améliore les propriétés émulsifiantes de ces protéines. Finalement, ces résultats confirment que les protéines de la VSM présentent un bon potentiel pour être utilisées, voire pour remplacer des ingrédients à base de lait ou d'œuf dans les préparations à base de viande. Nos résultats montrent également qu'il n'est pas nécessairement possible d'optimiser simultanément le rendement de récupération protéique, la pureté des protéines et les propriétés fonctionnelles recherchées : en effet, comme nous l'avons montré, le meilleur rendement et la pureté la plus élevée ne correspondent pas nécessairement aux meilleures fonctionnalités.

Du fait du changement de politique de l'entreprise UNICOPA concernant la valorisation de ces coproduits, nous n'avons pas poursuivi nos travaux sur la VSM et sommes passés à l'étude du poumon de bœuf.

Introduction

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Chapitre III

Résultats et Discussion

Première Partie

Étude de la Valorisation de la VSM

Chapitre IV

Résultats et Discussion

Deuxième Partie

Étude de la Valorisation du Poumon de Boeuf

Conclusions et Perspectives

Références

Résultats et Discussion

2ème Partie

Chapitre IV

Étude de la Valorisation du Poumon de Bœuf

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats concernant l'extraction et la concentration des protéines de poumon de bœuf. Comme dans le chapitre précédent, nous commencerons tout d'abord par discuter l'influence des conditions opératoires, à savoir le rapport massique entre le coproduit et l'eau, le pH, la température et la durée de l'étape de solubilisation des protéines. Nous insisterons sur les rendements protéiques obtenus pour toutes les conditions étudiées. Ensuite, nous présenterons de la même façon les résultats de l'étape de concentration et de purification des protéines solubilisées.

La deuxième partie de ce chapitre est dédiée aux propriétés physico-chimiques des protéines concentrées de poumon de bœuf (PCPB). Il s'agit de caractériser les solutions de PCPB en termes de propriétés rhéologiques et interfaciales afin de pouvoir intégrer ces protéines dans les formulations destinées aux opérations de transformation courantes de l'industrie alimentaire, telles que l'émulsification et le foisonnement. En effet, ces propriétés jouent un rôle clé sur la formation et la stabilisation des interfaces huile-eau ou gaz-liquide. Par exemple, si les protéines ne sont pas capables d'abaisser la résistance à la rupture des interfaces, la dispersion d'huile (resp. de gaz) lors de l'opération d'émulsification (resp. de foisonnement) ne présentera jamais une structure d'émulsion ou de mousse. En revanche, une adsorption trop lente aux interfaces de ces mêmes protéines, ou bien une viscosité trop faible de la phase continue, ne permettra pas la stabilisation des gouttes (resp. des bulles) et ne permettra donc pas au produit final d'atteindre la durée de vie désirée.

Nous avons donc attaché une attention toute particulière à la caractérisation des concentrats protéiques en termes de distribution des poids moléculaires, de solubilité, d'hydrophobicité de surface et de tensions de surface et interfaciale, mais également aux propriétés gélifiantes, émulsifiantes et moussantes, i.e. aux propriétés qui permettent de définir l'adaptabilité d'une formulation à une application alimentaire.

Toutefois, comme les propriétés des protéines dépendent aussi de leurs interactions avec les autres ingrédients, qu'elles soient attractives ou répulsives, nous étudierons donc également les propriétés de ces protéines en présence d'un polysaccharide, l'objectif étant de voir comment celui-ci va modifier les propriétés des protéines extraites de poumon de bœuf. Dans ce but, nous avons choisi un polysaccharide connu pour présenter une forte incompatibilité avec les protéines, notamment de lait : le xanthane. Cette démarche nous permettra ensuite de positionner les PCPB parmi les ingrédients commerciaux de référence mentionnés dans le tableau II.1.

La dernière partie de ce chapitre sera donc dédiée, à deux opérations unitaires : émulsification et foisonnement en batch et en continu ; il s'agit d'estimer la capacité des PCPB à former une émulsion en présence de xanthane, ou un produit foisonné dans un milieu réel (le foisonnement sera effectué avec une matrice complexe, en présence de polysaccharides tels que xanthane, guar et amidon, avec ou sans les lipides). Pour réaliser ces opérations en continu, nous avons utilisé deux types d'appareils : un dispositif de type rotor-stator appelé RS pour l'émulsification et une colonne agitée notée CF pour le foisonnement. Le principe de fonctionnement de ces deux appareils a déjà été décrit dans le chapitre II.

IV.1 Extraction des protéines de poumon de bœuf

IV.1.1 Étape de solubilisation des protéines

Comme dans le cas de la VSM, nous avons étudié l'influence des paramètres opératoires, à savoir le rapport massique coproduit/eau, le pH et la température pour différentes durées d'extraction. La procédure expérimentale est la même que celle utilisée dans le cas de la VSM. Nous ne reporterons donc que les résultats expérimentaux sans discuter des conditions choisies.

IV.1.1.1 Effet du rapport massique (poumon de bœuf/eau)

Nous avons étudié l'influence du rapport massique, poumon de bœuf/eau à 20, 30, 40 et 50% p/p, sur le rendement protéique de l'extraction. Sur la figure VI.1, nous présentons le rendement d'extraction moyenné sur l'ensemble des essais, ainsi que les incertitudes expérimentales associées, pour différents rapports massiques poumon de bœuf/eau. On remarque que le rendement d'extraction passe de 50% à environ 68% lorsque le rapport « masse de poumon sur eau » diminue de 50% à 20%. On peut tout d'abord expliquer ce

résultat par un effet de saturation de la solution en protéines ; toutefois, la quantité de protéines en solution augmente en valeur absolue avec la masse de coproduit mis en solution. Une autre explication possible est l'augmentation de la viscosité de la suspension résultant de l'augmentation de la quantité de matières solides en suspension : celle-ci est susceptible de modifier les conditions de mélange et, par conséquent, de rendre la solubilisation des protéines plus difficile. Le choix du rapport « masse de produit sur eau » dépend donc essentiellement de critères technico-économiques : en effet, un rapport élevé conduit à un rendement de solubilisation des protéines plus faible, mais en contrepartie, il fournit des solutions plus concentrées, d'où une meilleure productivité ; de plus, les rapports élevés facilitent les étapes de concentrations des solutions protéiques, en réduisant la quantité d'eau à éliminer.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne disposons pas de tous les éléments nécessaires pour effectuer une optimisation technico-économique du procédé et nous avons donc retenu pour la suite de notre travail un rapport de 20% qui favorise plutôt le rendement de solubilisation des protéines.

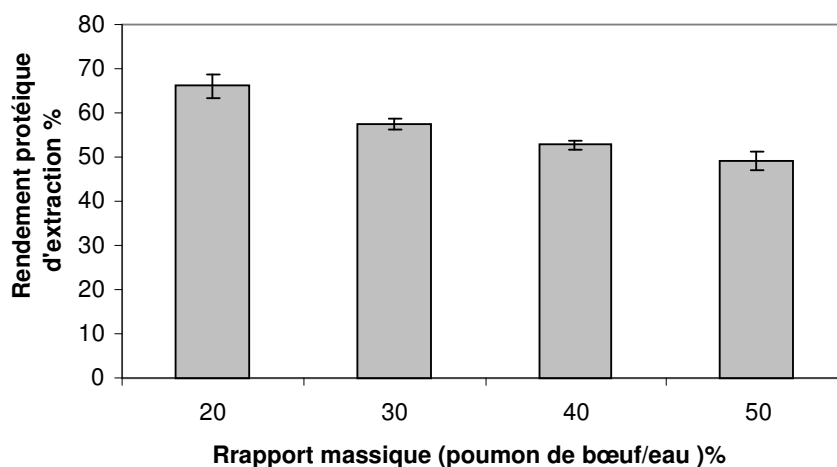


Figure IV.1 : Influence du rapport massique (poumon de bœuf/eau) sur le rendement d'extraction protéique (pH 9, 60 min).

IV.1.1.2 Effet du pH

Comme pour la VSM, l'influence du pH sur le rendement protéique de l'étape de solubilisation a été étudiée entre 4 et 9. Les résultats sont présentés sur figure IV.2. Pour l'ensemble de ces essais, l'extraction des protéines a été réalisée en utilisant un rapport massique coproduit/eau égal à 20% (p/p), une température de 20°C et une durée d'extraction

de 60 min. D'après la figure IV.2, il est bien clair que l'augmentation de pH de 4 à 9 conduit à une augmentation importante du rendement de récupération protéique ; celui-ci est très faible à pH 4, environ 10% ; en revanche, il atteint 68% à pH 9. Dans la suite de ce travail, nous retiendrons la valeur de 9 pour le pH lors de l'étape de solubilisation.

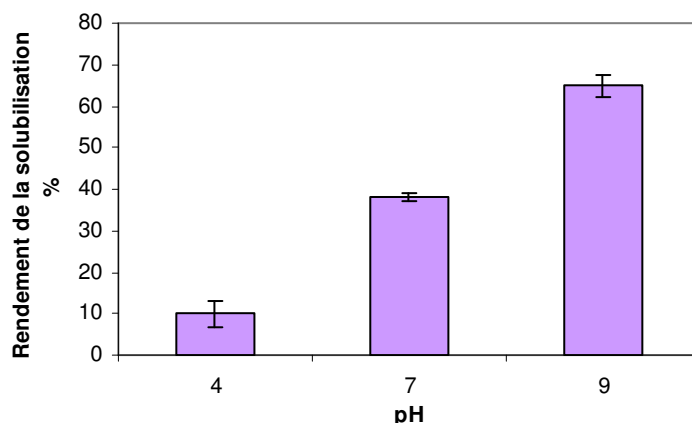


Figure IV.2 : Effet du pH sur l'étape de la solubilisation des protéines de poumon de bœuf.

IV.1.1.3 Effet de la température et de la durée d'extraction

Les influences respectives de la durée d'extraction à 30, 60 et 120 min, et de la température à 20 30 et 40°C, ont été également étudiées. Les résultats sont résumés dans le tableau IV.1, chaque valeur reportée dans le tableau correspondant à la moyenne de trois essais. Les résultats montrent que le rendement protéique augmente faiblement avec la durée d'extraction. En revanche, pour les temps d'extraction de 30 et 60 min, l'augmentation de la température n'a aucun effet sur le rendement de solubilisation, la variation observée restant dans le domaine de l'incertitude expérimentale. Toutefois, pour un temps d'extraction de 120 min, on observe une baisse du rendement quand la température passe de 30°C à 40°C. On peut supposer qu'une extraction prolongée pendant 120 min à 40°C peut conduire à une dénaturation partielle des protéines et donc une diminution du rendement de solubilisation.

Sur la base des résultats du tableau IV.1, nous avons retenu pour la suite de ce travail les conditions suivantes pour l'étape de la solubilisation des protéines :

- Rapport massique poumon de bœuf/eau : 20% ;
- Durée d'extraction : 60 min ;
- pH 9 ;
- Température : 20 °C.

En effet, l'absence d'effet de la température nous conduit à travailler à la température ambiante, ce qui est aussi l'optimum énergétique. Pour la durée d'extraction, les gains en rendement résultant de l'augmentation de durée sont si faibles qu'un compromis a été retenu, la durée de 120 min étant jugée trop longue, au moins au niveau des essais de laboratoire.

IV.1.2 Étape purification/concentration des protéines

IV.1.2.1 Purification/concentration par procédé membranaire

Comme dans le cas de la VSM, nous avons d'abord tenté d'effectuer une concentration par filtration tangentielle en utilisant une membrane de microfiltration (pores de 1,4 μm). Sur la base des résultats obtenus pour la VSM, nous avons effectué cette opération à 30°C et sous 2 bars pression transmembranaire. La performance de la MF a été estimée par la mesure du débit de perméat en fonction de temps (figure IV.3). Comme pour la VSM, le débit de perméat diminue rapidement au cours du temps, même s'il est plus élevé vers 270 L/(h.m²) que celui obtenu avec la VSM (100 L/(h.m²)) en début d'opération. L'augmentation du débit de perméat par rapport à la VSM dans les premières cent minutes de filtration est vraisemblablement due à la plus faible teneur en matières grasses du poumon de bœuf. Cependant, le colmatage de la membrane conduit à un débit final quasiment identique, de l'ordre de 30-40 L/(h.m²). Par ailleurs, le rendement total de la récupération protéique dans le perméat de la MF est d'environ 40 % (p/p), ce qui signifie qu'il y a toujours une quantité non négligeable de protéines qui reste dans le rétentat.

Tableau IV.1 : Effets du temps et la température sur la solubilisation des protéines de poumon de bœuf.

Temps d'extraction (min)	Température (°C)	Rendement protéique (%)
30	20	65±2
	30	65±3
	40	66±3
60	20	69±4
	30	70±2
	40	70±3
120	20	72±3
	30	76±4
	40	68±3

Rapport poumon de bœuf/eau=20% (p/p), pH 9

IV.1.2.2 Purification/concentration par précipitation au point isoélectrique

La démarche pour faire précipiter les protéines à leur pI est strictement la même que celle utilisée précédemment dans le cas de la VSM. Il s'agit d'effectuer la précipitation à un pH entre 4 et 4,5. Les protéines précipitées ont été récupérées par centrifugation, puis lyophilisées, afin d'obtenir une poudre sèche dénommée « PCPB » dans la suite de ce travail. Le rendement global de récupération des protéines dans le PCPB est de $40\pm5\%$.

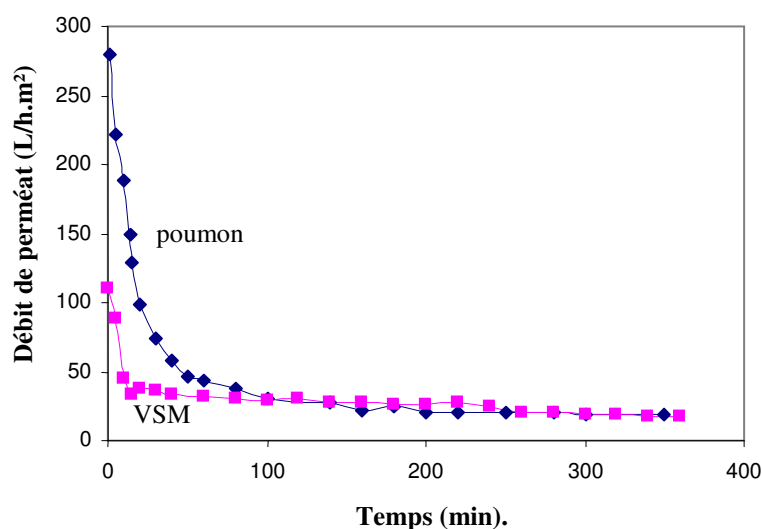


Figure IV.3 : Débits des perméats issus de la VSM et du poumon de bœuf en fonction du temps

Tableau IV.2 : Composition de la fraction solubilisée lors de l'extraction (après lyophilisation) et du PCPB lyophilisé.

Composition	Fraction solubilisée (après lyophilisation)	PCPB (précipitation, lyophilisation)
Lipides libres (% p/p)	16±1	15±2
Protéines récupérables (% p/p)	67±2	76±2
Collagène (% p/p)	0,5±0,1	0,5±0,1
Eau (% p/p)	8,6±0,1	2,8±0,1
Protéine/matière sèche (% p/p)	73±2	78±2
Lipides/matière sèche (% p/p)	17,5±3	15,4±2
Protéines/lipides	4,2±0,6	5,0±0,8

La composition finale du PCPB en poudre est indiquée dans le tableau IV.2. Nous avons également présenté dans ce tableau la composition des solutions protéiques issues de l'étape de solubilisation, après avoir lyophilisé ces solutions. Dans ce tableau, on constate que la teneur en protéines dans le PCPB est de 76% (p/p), ce qui correspond à un concentré protéique commercial, mais avec un taux de lipides élevé dans les impuretés (15% p/p). L'augmentation du rapport massique protéine/matière sèche, si l'on compare le PCPB (78%) aux matières premières (64% dans le tableau III.1), résulte principalement de l'élimination du collagène ; en effet, le rapport protéines/lipides reste assez proche, à l'erreur expérimentale près, entre la matière première (4,8 dans le tableau III.1), la fraction solubilisée (4,2) et le PCPB (5,0). De même, la quantité de lipides dans la matière sèche ne diminue pas sensiblement lors de la précipitation au pI (tableau IV.2). Cela confirme que les protéines sont fortement associées aux lipides dans le poumon de bœuf. En fait, les poumons des mammifères sont connus pour contenir des protéines de faibles poids moléculaires (5-18 kDa), très fortement liées à des lipides, et qui sont des agents tensioactifs fortement hydrophobes (Galdston et al, 1969 ; Warr et al, 1987), ce qui est en accord avec nos résultats.

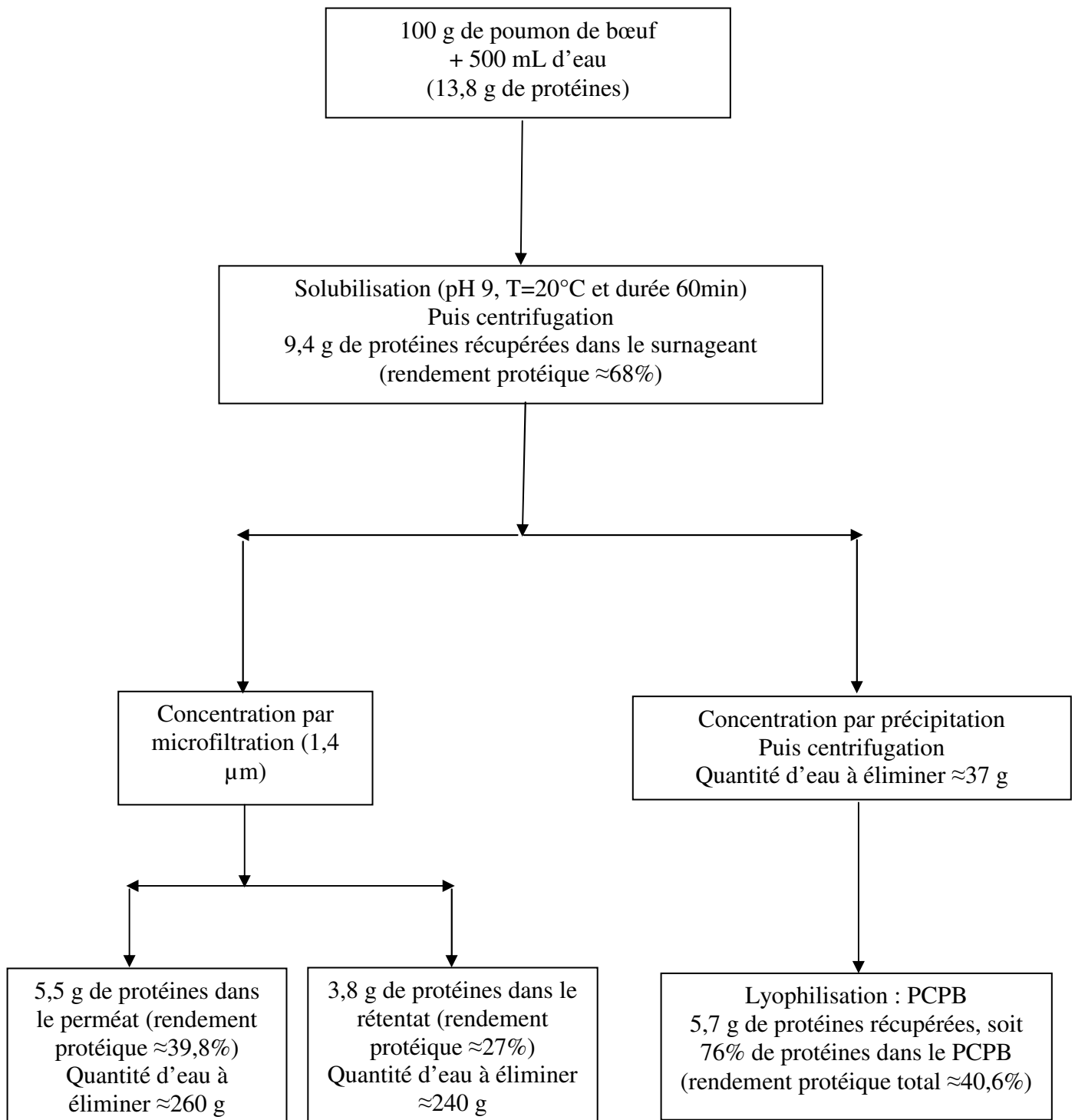


Figure IV.4 : Bilan global du fractionnement des protéines sur une base de 100 g de poumon de bœuf.

En résumé, la figure IV.4 présente un bilan global sur la récupération des protéines de poumon de bœuf qui compare MF et précipitation au pI. Ce bilan est fondé sur une base de sur 100 g de matière première (i.e. poumon de bœuf). On constate que le rendement protéique de l'étape de la solubilisation est de 68% par rapport à la matière première. Suite à cette étape, le rendement dépend du mode de concentration choisi : par précipitation au pI, le rendement global de récupération (i.e. toujours par rapport à la quantité initiale de protéines) est de 40,6% ; par MF, les protéines sont réparties à la fois dans le perméat (5,5 g, soit un rendement de 40%) et dans le rétentat (3,8 g soit un rendement de 27%). On notera que ces rendements ne tiennent donc pas compte de la quantité d'eau à éliminer. Ainsi, la quantité d'eau à éliminer pour concentrer ces protéines après précipitation est d'environ 37 mL, ce qui est beaucoup plus faible que pour le perméat (260 mL) ou le rétentat (240 mL) de la MF.

En conclusion, bien que la précipitation au pI à pH 4 conduise au même rendement protéique que la microfiltration (côté perméat), elle reste cependant plus économique dans la mesure où la quantité d'eau à éliminer pour concentrer la solution est bien plus faible que pour le perméat ou le rétentat de la MF. C'est donc la fraction dénommée PCPB, obtenue par précipitation au pI, qui sera retenue pour la suite de ce travail.

IV.2 Caractérisation du PCPB

Les propriétés techno-fonctionnelles des protéines sont influencées par trois groupes de facteurs. Le premier groupe est directement lié à la structure des protéines : solubilité, masse moléculaire, hydrophobicité et tension de surface, tension interfaciale... Le deuxième comprend les conditions opératoires : notamment, température, pH et force ionique. Enfin, le dernier groupe de facteurs affectant les propriétés fonctionnelles résulte des interactions entre les protéines et les autres ingrédients, tels que les polysaccharides et les lipides (Arêas et al, 1993). Nous allons donc, dans un premier temps, caractériser les protéines du PCPB avant d'examiner plus en détail les propriétés fonctionnelles de ces protéines, seules ou en mélange.

IV.2.1 Solubilité des protéines

Les données sur la solubilité des protéines sont d'une importance capitale, tout d'abord parce qu'elles déterminent les conditions optimales d'extraction de ces protéines, mais également parce qu'elles sont un critère fondamental lors de la sélection des ingrédients fonctionnels. Par exemple, la solubilité des ingrédients protéiques en poudre au pH de préparation est indispensable et peut donc orienter le choix de l'ingrédient à utiliser par le

transformateur (Cheftel et al, 1985). La solubilisation des protéines de poumon de bœuf en fonction du pH a déjà fait l'objet d'une étude que nous avons présentée précédemment ; dans cette partie, nous ne nous intéressons uniquement qu'à l'étude de la solubilité du PCPB, c'est-à-dire la fraction lyophilisée après la précipitation à pH acide.

La solubilité relative des protéines, i.e. par rapport à la quantité de protéines mesurés en solution, est présentée sur la figure IV.5 en fonction du pH. Son évolution a typiquement une forme en V ou en U pour laquelle la valeur minimale correspond au pI des protéines (Cheftel et al, 1985), ce qui est le cas pour le PCPB sur la figure IV.5. Cependant, parce que les extraits correspondent à un mélange complexe de protéines de viande, une forme en U avec une base assez large, entre pH 4 et pH 6, est observée. Il est également intéressant de noter que les protéines de PCPB présentent une assez bonne solubilité relative dans une solution à 2% p/p. En effet, comme le montre la figure IV.5, plus de 70% de la fraction protéique est soluble à pH 7, bien qu'une fraction de ces protéines soit probablement émulsionnée par les lipides présents dans le PCPB.

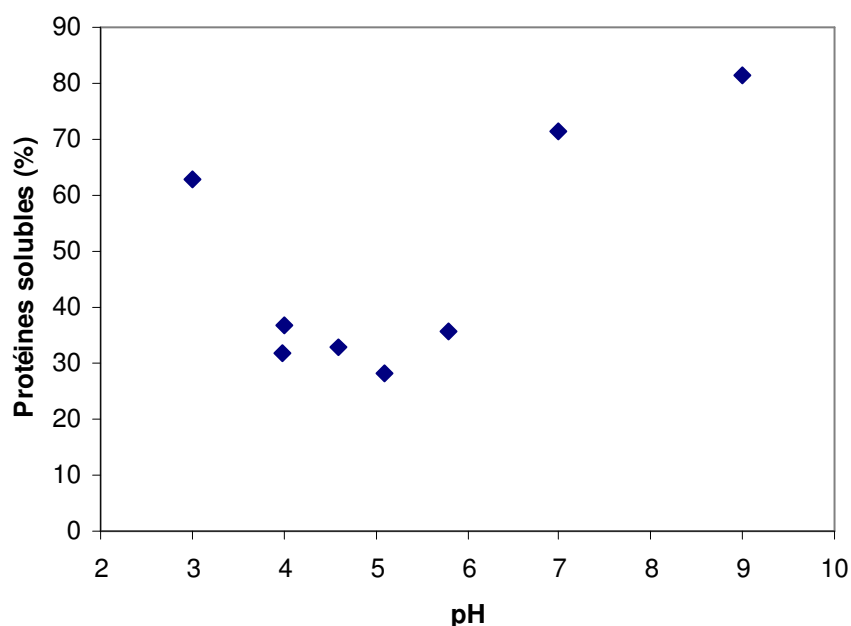


Figure IV.5: Solubilité relative des protéines de PCPB (2% p/p) en fonction du pH

L'influence de la quantité de PCPB mise en solution sur la solubilité absolue est illustrée par la figure IV.6. Sur cette figure, on remarque que la solubilité des protéines augmente avec la quantité de PCPB mise en solution. La solubilité relative demeure constante, égale à 70 %, dans la gamme étudiée à pH 7, ce qui signifie que cette valeur est intrinsèque au PCPB à pH 7 et donc pas liée à la saturation de la solution.

En conclusion, on notera que les PCPB ont une bonne solubilité relative dans l'eau, sauf à pH acide, bien que celle-ci soit légèrement inférieure à celle des isolats commerciaux de protéines qui, il faut le noter, ont bien souvent une teneur en protéines dans la matière sèche supérieure à 80%, voire à 90%, en particulier dans le cas des protéines de lait ou de blanc d'œuf (Cheftel et al, 1985), ce qu'il faut comparer aux 78% de protéines du PCPB.

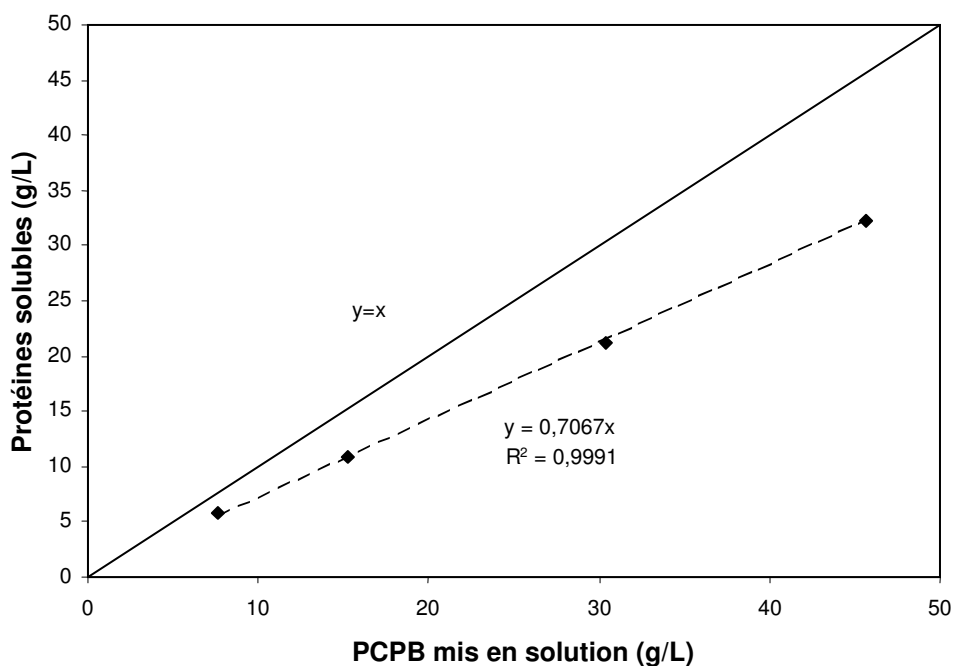


Figure IV.6: Solubilité des protéines de PCPB en fonction de la quantité de PCPB mise en solution à pH 7

IV.2.2 Masses moléculaires des protéines de PCPB

IV.2.2.1 SDS-PAGE

L'électrophorégramme du PCPB est présenté sur la figure IV.7. Cette figure compare les marqueurs (A), le PCBP non filtré après sa mise en solution (B), et la solution filtrée sur membrane à 0,45 μm (C). L'intensité des bandes montre que les protéines de PCPB ont un spectre de masses moléculaires assez large. Leurs masses moléculaires (M_w) sont réparties en cinq classes, de la façon suivante : environ 17% ont une M_w inférieure à 20 kDa, environ 31% ont une M_w comprise entre 25-30 kDa, 25% ont une M_w de 40 kDa, 14% ont une M_w de 55 kDa et enfin 13% ont une M_w entre 70-75 kDa. Après filtration à 0,45 μm , seules les fractions de faibles poids moléculaires (25 et 15 kDa) ont été détectées, mais le rapport entre les intensités de ces deux bandes reste assez proche de celui obtenu dans les échantillons non filtrés. Cela démontre qu'un grand nombre de protéines qui auraient dû traverser sans

difficulté la membrane sont restées prisonnières sur celle-ci, comme en MF, ce qui tend à prouver que les protéines observées en (B) font soit partie d'agrégats protéiques dissociés en présence de SDS, soit partie de couches adsorbées sur les matières grasses qui ont été déplacées par le SDS.

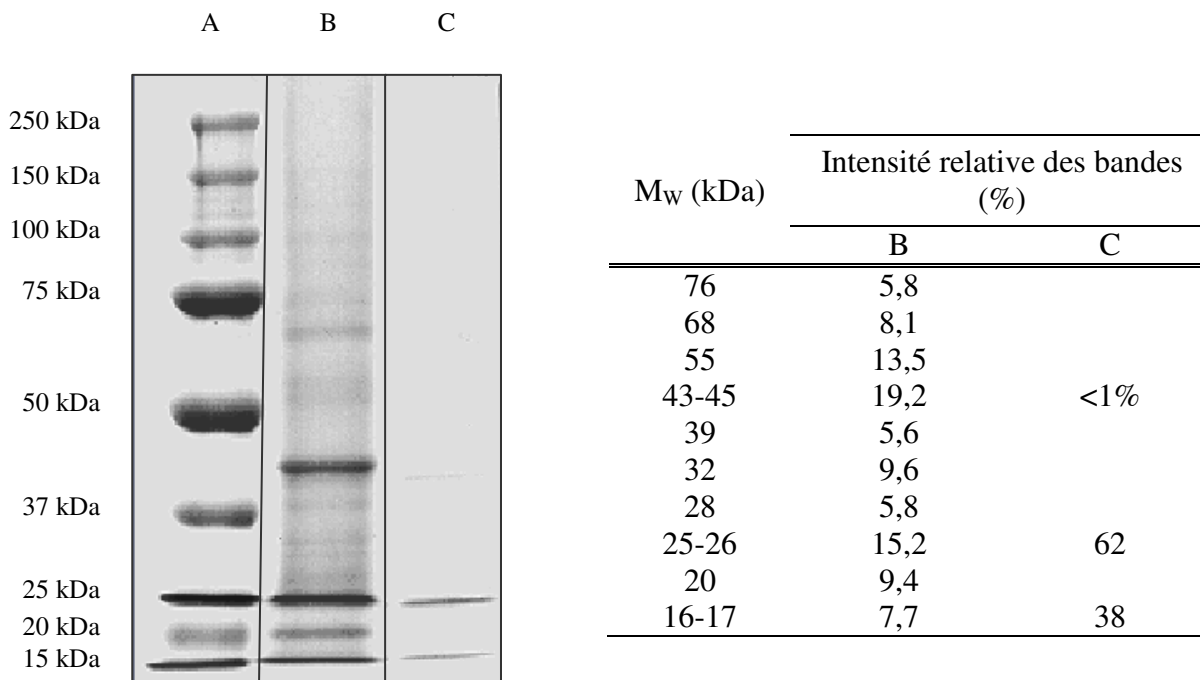


Figure IV.7 : SDS-PAGE : (A) marqueurs ; (B) PCPB non filtré; (C) PCPB après filtration à 0,45 µm.

IV.2.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique (GPC)

Nous allons maintenant nous intéresser plus en détail à la fraction filtrée. Le chromatogramme obtenu par exclusion stérique (ou GPC : perméation sur gel) des solutions préalablement filtrées de PCPB est présenté sur la figure IV.8. Cette analyse donne accès à des informations complémentaires à la SDS-PAGE sur la fraction « soluble » des protéines en l'absence de SDS. Comme le montre la figure IV.8, les protéines solubles de PCPB se composent de plusieurs fractions. La masse moléculaire moyenne de chacun des pics correspondant à des fractions protéiques dans le chromatogramme est reportée dans le tableau IV.3 : il faut rappeler que seuls les pics élués entre 10 mL et 20 mL correspondent aux masses moléculaires de la courbe d'étalonnage. Ainsi, les pics ayant des volumes élués plus élevés représentent des impuretés, telles que de petits composés moléculaires et ioniques (moins de 1 kDa), tandis que les protéines de volumes élués moins élevés que 10 mL correspondent vraisemblablement à des agrégats protéiques solubles. En résumé, le tableau IV.3 montre que les protéines du PCPB ont des masses moléculaires étalées entre 3 et 500 kDa. Il faut

cependant mentionner que sur le chromatogramme obtenu par mesure de d'absorbance dans l'UV (figure IV.8), l'aire relative de chaque pic ne peut être directement reliée au pourcentage en masse de la fraction protéique correspondante, l'absorbance dépendant de la structure de la protéine. Cependant, les principales protéines détectées par SDS-PAGE, c'est-à-dire celles de poids moléculaires 13, 36 et 77 kDa correspondant aux principales bandes de la figure IV.7, ont également pu être identifiées sur le chromatogramme ; en fait, seule la fraction de poids moléculaire 55 kDa observée par SDS-PAGE n'a pu être détectée par GPC : ceci peut être attribué à la faible absorbance UV de ces protéines, ou alors au fait qu'elles correspondent à des sous-unités protéiques de plus grandes structures, dissociées en présence de SDS, telles que les agrégats que l'on peut clairement identifier sur la figure IV.8 pour les volumes élués inférieurs à 13 mL.

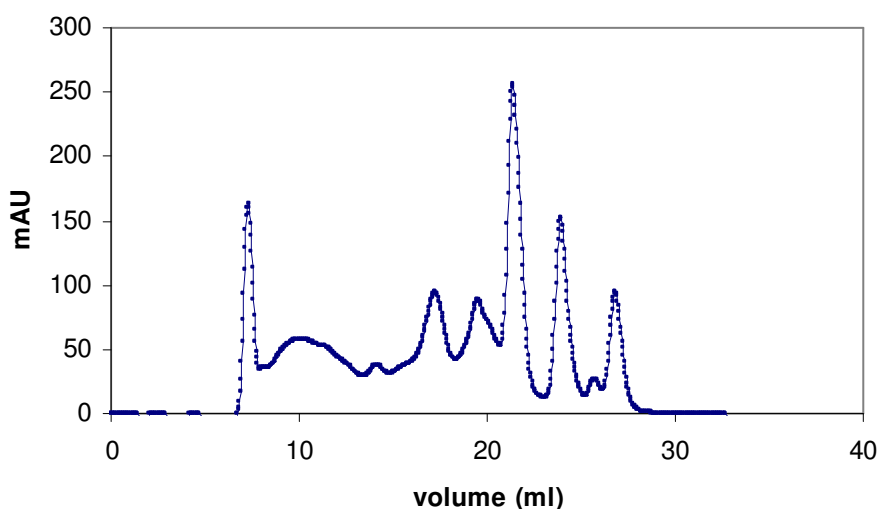


Figure IV.8 : Chromatogramme UV des protéines de PCPB après filtration à 0,45 µm

Afin d'obtenir des informations quantitatives, le chromatogramme obtenu à partir de la mesure de l'indice de réfraction est présenté sur la figure IV.9. Une simple comparaison visuelle montre qu'il diffère très fortement de celui de la figure IV.8. En effet, le pic correspondant aux masses moléculaires les plus faibles, environ 3-5 kDa, représente la fraction la plus importante au sein des protéines solubles. Ceci peut être attribué à la présence de peptides ou de protéines de petites tailles. Leur présence en grande quantité peut, tout d'abord, résulter des traitements thermomécaniques appliqués au poumon de bœuf, tels que le broyage et les traitements chimiques subits pendant l'étape de solubilisation, ainsi que de la solubilité élevée de ces petites molécules pendant les différentes opérations d'extraction et de purification. Une autre explication possible est que les poumons des mammifères sont connus

pour contenir des protéines de faibles poids moléculaires, entre 5-18 kDa, qui sont de très bons agents tensioactifs fortement hydrophobes et jouent un rôle essentiel sur la stabilité alvéolaire (Galdston et al, 1969 ; Warr et al, 1987).

Tableau IV.3 : Masses moléculaires moyennes des fractions de PCPB obtenues par GPC

Volume élué (mL)	Masse moléculaire (kDa)
10,3	500
11,7	280
12,6	190
14,3	77
15,7	36
17,4	13
19,6	3

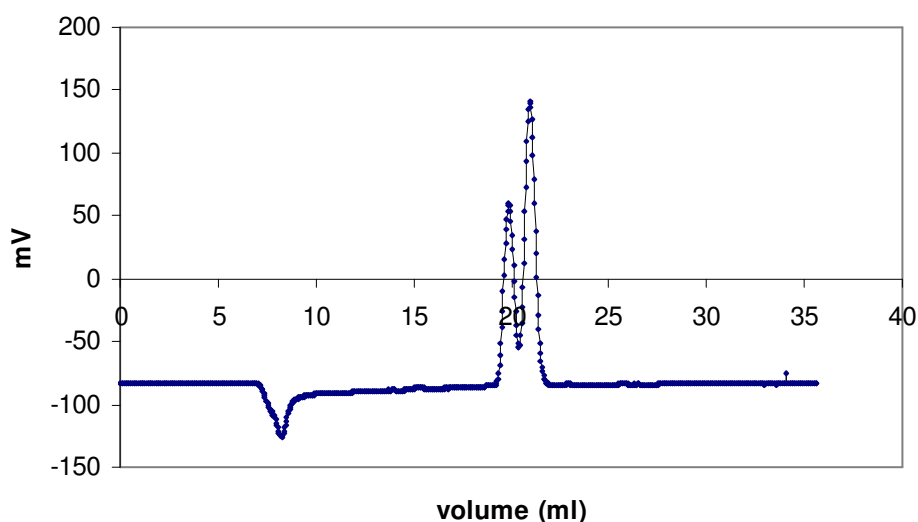


Figure IV.9 : Chromatogramme (indice de réfraction) des protéines de PCPB après filtration à 0,45 µm

En résumé, on retiendra que les protéines de PCPB présentent un spectre de masses moléculaires assez large, avec d'une part, des agrégats protéiques solubles et insolubles incluant éventuellement de la matière grasse, et d'autre part, des composés de faibles masses moléculaires. Cette distribution des tailles peut avoir un effet très important sur les propriétés techno-fonctionnelles de ces protéines. Par exemple, les agrégats/assemblages protéiques solubles sont connus pour améliorer fortement la formation et la stabilisation des mousses obtenues à partir d'un isolat de protéines de lactosérum (Davis et al, 2004) ; ainsi, de nombreux travaux récents ont pour but de contrôler l'agrégation des protéines de lait ou de

blanc d'œuf lors des traitements thermomécaniques afin de maîtriser leurs fonctionnalités. De plus, le PCPB contient une fraction protéique de faible poids moléculaire, potentiellement capable de diffuser rapidement vers les interfaces dans une émulsion ou une mousse et donc d'agir comme un tensioactif.

IV.2.3 Hydrophobicité de surface

La figure IV.10 présente l'évolution de l'intensité relative de fluorescence du PCPB en fonction de la concentration en protéines. Cette évolution reste quasiment linéaire ; la pente de la droite correspond alors à la valeur de l'hydrophobicité de surface des protéines de PCPB. Nous avons comparé cette valeur à celles des ingrédients commerciaux dans le tableau IV.4. D'après ce tableau, l'hydrophobicité de surface des protéines de PCPB est plus élevée que celle des autres protéines commerciales, excepté l'isolat de soja qui est connu pour être un très bon émulsifiant, en particulier dans le cas des émulsions concentrées. On peut donc considérer que les concentrés protéiques de poumon de bœuf constituent un « bon » agent émulsifiant : en effet, selon Dickinson (1992), un bon agent émulsifiant doit impérativement présenter une hydrophobicité de surface élevée. A l'inverse des propriétés émulsifiantes, on notera que la corrélation entre l'hydrophobicité de surface et les propriétés moussantes est moins marquée (Dickinson, 1992) : en effet, les parties hydrophobes des protéines peuvent facilement pénétrer dans une phase organique telle qu'une huile, tandis que ce comportement reste très limité quand cette phase est remplacée par de l'air (Bos et van Vliet, 2001). On notera également que la relation entre l'hydrophobicité de surface et la capacité des protéines à former et stabiliser une émulsion n'est pas encore totalement établie et qu'elle fait encore l'objet de nombreuses discussions dans la littérature : elle dépend en particulier de la méthode utilisée pour mesurer l'hydrophobicité de surface (Nakai, 2003) et de la solubilité des protéines (Li-Chan et al, 1984 ; Molina et al, 2001). De plus, la présence de lipides dans le PCPB peut interférer lors de la mesure de l'hydrophobicité de surface (Nakai, 2003), même si elle constitue en même temps une preuve supplémentaire qui confirme que les protéines du PCPB ont une affinité élevée pour des lipides. L'hydrophobicité de surface et la teneur élevée en lipides du PCPB peuvent également être liées, pour partie, à la présence de surfactants dans les protéines pulmonaires : ceux-ci sont connus pour être des lipoprotéines riches en phospholipides et fortement hydrophobes (Galdston et al, 1969). Il est possible que pour cette raison que la séparation des lipides soit difficile pour le PCPB avec les méthodes conventionnelles d'extraction des lipides (Arjomaa et le Hallman, 1988).

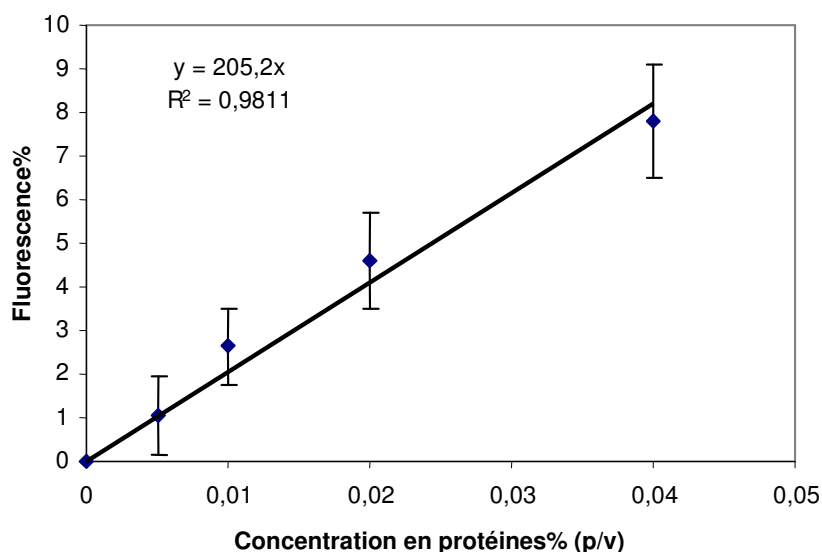


Figure IV.10: Intensité de fluorescence en fonction de la concentration en protéines.

Tableau IV.4: Hydrophobicité de surface et tensions de surface et interfaciale du PCPB et des ingrédients commerciaux.

Type de protéines	Hydrophobicité de surface (ANS)	Tension de surface (mN/m)	Tension interfaciale (mN/m)
PCPB	205±9	42±1	10,8±0,4
Lactosérum	72±6	51±0,5	15±2
Blanc d'œuf	66±4	47±0,5	14±1
Isolat de soja	334±2	43,7±0,5	12,3±0,6
Na-caséinates	165±10	49,8±0,5	15±1

IV.2.4 Tension de surface et tension interfaciale

Les figures IV.11 et IV.12 montrent les évolutions respectives de la tension interfaciale et de la tension de surface des solutions protéiques de PCPB et des protéines commerciales à 0,1% (p/p) en fonction du temps. Le tableau IV.4 résume pour comparaison les valeurs mesurées respectivement à 600 et 180 secondes de ces mêmes tension interfaciale et tension de surface. Ce tableau montre clairement que le PCPB présente la tension interfaciale la plus basse et que sa valeur est bien plus faible que celle des protéines commerciales, ce qui est en accord avec sa grande hydrophobicité de surface. D'un point de vue cinétique, non seulement le PCPB donne instantanément une tension interfaciale bien plus basse que les autres protéines, mais l'écart entre la courbes du PCPB et celles des autres ingrédients augmente au cours du temps (figure IV.11). Qualitativement, les figures IV.11 et IV.12 montrent que les tensions interfaciales et de surface d'une solution de PCPB suivent les mêmes tendances et

que le PCPB correspond toujours à la valeur minimale. Toutefois, l'ordre des tensions de surface est différent pour les ingrédients commerciaux, à savoir : PCPB < isolat de soja < protéines de blanc d'œuf < caséinates de sodium < protéines sériques. Pour le PCPB, ces résultats peuvent être expliqués par la présence en grande quantité de protéines de faibles masses moléculaires qui peuvent diffuser rapidement et stabiliser les interfaces. La forme de la courbe de la tension interfaciale en fonction du temps montre également que le film interfacial est progressivement renforcé par la présence de fractions de protéines de poids moléculaires plus élevés qui diffusent plus lentement, mais qui contribuent à la fois à diminuer de la tension interfaciale et à la stabilisation des interfaces. En effet, comme l'ont montré Davis et Foegeding (2004) dans le cas de WPI polymérisés, la présence d'agrégats protéiques solubles améliore la viscoélasticité et la stabilité interfaciale des films.

En conclusion, on retiendra que le PCPB a de bonnes propriétés tensioactives grâce à un spectre de masses moléculaires très large, une hydrophobicité de surface élevée et aussi parce qu'il existe une bonne affinité entre une fraction de ses protéines et les lipides (Camacho et al, 1996 ; Taneva et al, 1998). Il faut toutefois noter que comme pour l'hydrophobicité de surface, la relation entre les propriétés émulsifiantes des protéines et la tension interfaciale n'est pas simple. De même, les tentatives pour établir une relation quantitative entre les propriétés moussantes et la tension de surface sont également nombreuses dans la littérature, sans que cela ait abouti à des résultats concluants (Kitabatake et Doi, 1982). Toutefois, tous s'accordent sur le fait que ces grandeurs donnent malgré tout une indication sur les propriétés moussantes et émulsifiantes des protéines.

IV.3 Propriétés techno-fonctionnelles des protéines de PCPB

Dans ce qui suit, nous nous intéresserons aux fonctionnalités des protéines de PCPB à pH 7 dans l'eau. Afin de déterminer l'influence du mode de purification des protéines sur leurs fonctionnalités, nous comparerons les propriétés fonctionnelles des protéines concentrées issues des perméats de la microfiltration à celles du PCPB obtenu par précipitation au pI. Nous comparerons également les propriétés fonctionnelles du PCPB à celles des ingrédients commerciaux du tableau II.1.

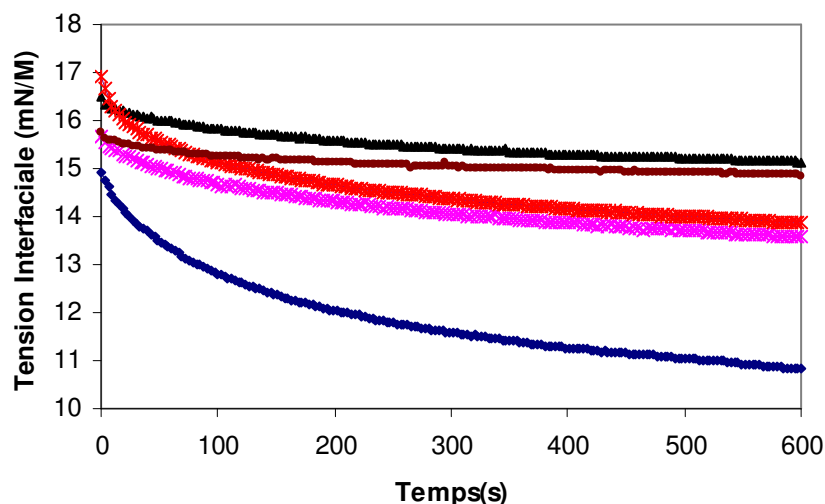


Figure IV.11 : Évolution de la tension interfaciale en fonction de temps : PCPB (♦), protéines de blanc d'œuf (*), isolat de soja (x), WPI (▲) Na-CN (●)

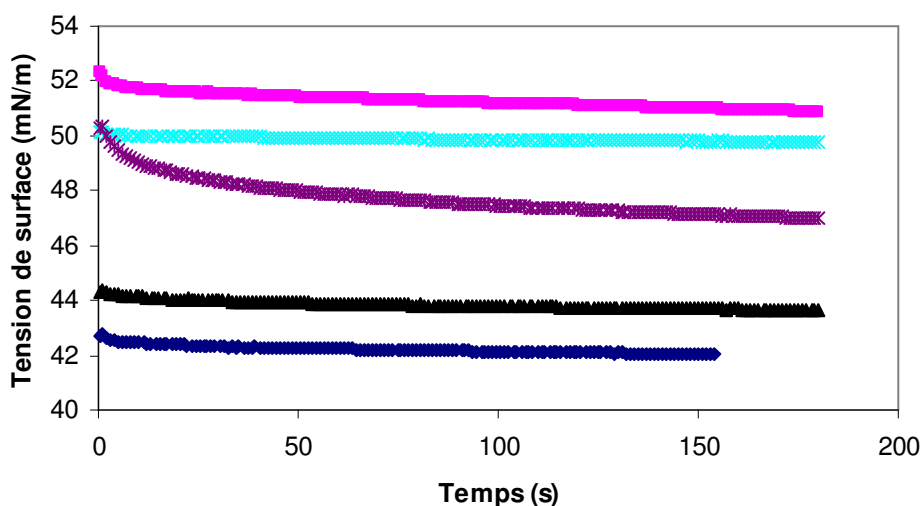


Figure IV.12 : Évolution de la tension de surface en fonction du temps : PCPB (♦), protéines de blanc d'œuf (*), isolat de soja (▲), WPI (■) Na-CN (x)

IV.3.1 Propriétés gélifiantes

L'évolution du module élastique G' en fonction de la température pour les solutions de PCPB et celles issues de MF à 2% (w/v) est présentée sur la figure IV.13. Cette figure montre que les protéines de PCPB ont de meilleures propriétés gélifiantes que celles issues des perméats de MF : en effet, la température de gélification et la force de gel sont respectivement de 50°C et 30 000 Pa pour les protéines du PCPB et de 60°C et 15 000 Pa pour celles issues de la MF. Ces résultats confirment que la présence d'agrégats protéiques insolubles dans le PCPB (qui sont au contraire éliminés par le traitement membranaire) facilite la formation d'un

gel par chauffage. Ces résultats montrent également que les propriétés fonctionnelles des protéines de poumon de bœuf sont principalement liées à la présence d'une fraction particulière des protéines, tandis que l'autre ne joue qu'un rôle secondaire. Il semble donc que le mode opératoire de purification des protéines a un effet non négligeable sur leur fractionnement et leur fonctionnalité.

Finalement, la comparaison entre la température de gélification et la force de gel du PCPB et celles des ingrédients commerciaux (figure III.7) montre que le PCPB a de meilleures propriétés gélifiantes que les ingrédients de référence. Cependant, ces propriétés restent moins bonnes que celles des extraits et concentrés de poumon de porc obtenus dans les perméats de MF (Masselot, 2005), et que celles des protéines de VSM obtenues par précipitation avant extraction de la matière grasse et de MF (figure III.8).

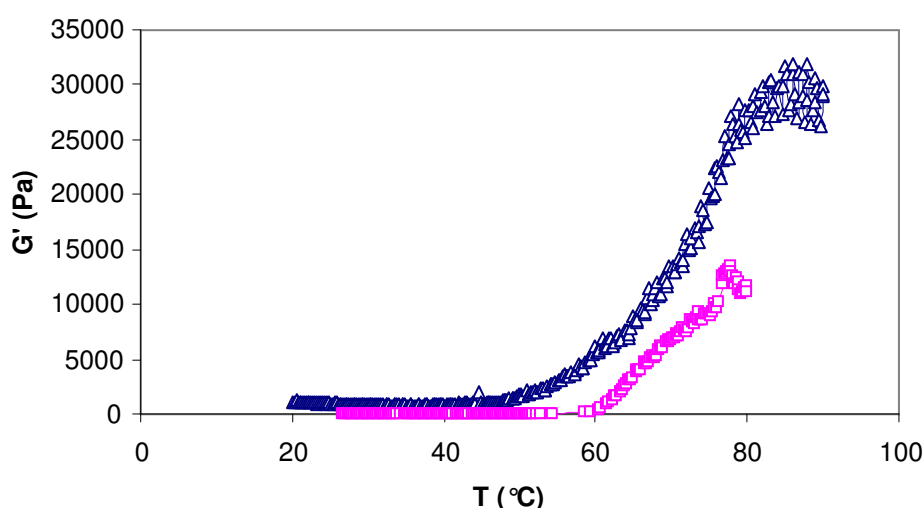


Figure IV.13 : Évolution du module élastique (G') en fonction de la température pour les protéines issues du perméat de la MF (□) et de la précipitation (PCPB, Δ).

IV.3.2 Propriétés émulsifiantes

La capacité émulsifiante (EC), l'indice de l'activité émulsifiante (EAI) et l'indice de la stabilité émulsifiante (ESI) du PCPB, des protéines issues des perméats de la MF et des ingrédients commerciaux sont résumés dans le tableau IV.5. La capacité émulsifiante a été mesurée en suivant la conductivité d'une solution de protéines lors d'un ajout progressif d'huile. Une diminution brutale de la conductivité, synonyme de séparation de phase, correspond alors à la quantité maximale d'huile que les protéines sont capable d'émulsionner (figure IV.14). Le tableau IV.5 fournit les valeurs de la capacité émulsifiante (EC) des protéines utilisées dans ce travail. Il semble donc que les caséinates de sodium (Na-CN) et

que l'isolat de soja présentent les plus grandes capacités émulsifiantes et que le PCPB affiche un comportement intermédiaire, meilleur que les protéines sériques et les protéines de blanc d'œuf. La performance du PCPB est remarquable si l'on considère que ce produit est un concentré de protéines et qu'il est comparé à des isolats. De plus, la valeur de EC, 320 mL/g de protéines, est beaucoup plus élevée que celles typiquement utilisées dans l'industrie alimentaire et on peut considérer que les résultats sont tout à fait satisfaisants pour le PCPB.

Dans le tableau IV.5, on remarque également que parmi les ingrédients cités, les protéines de PCPB présentent la plus forte activité émulsifiante. Il s'agit d'un résultat très intéressant, tout d'abord parce que cette activité a été comparée à celle des isolats de protéines, et ensuite parce que le PCPB contient déjà environ 15% (p/p) de lipides. Il semble donc que contrairement au comportement le plus couramment observé pour les produits alimentaires, i.e. l'adsorption compétitive entre les protéines et les agents de surface (Bos et van Vliet, 2001), il existe dans le cas présent une très grande affinité entre les protéines et les lipides de PCPB, malgré la présence possible de mono- et diglycérides d'acides gras et de phospholipides. Ces résultats indiquent que les lipides sont probablement associés à des protéines hydrophobes dans des lipoprotéines, ce qui favorise simultanément la formation et la stabilisation de l'émulsion.

En ce qui concerne la stabilité, la valeur de ESI pour le PCPB reste similaire à celles des protéines commerciales connues pour leurs bonnes propriétés émulsifiantes, en particulier Na-CN. Toutefois, il faut noter que le fait que le WPI présente la stabilité la plus élevée (tableau IV.5) ne signifie pas qu'il s'agit d'un bon agent émulsifiant, puisque le WPI affiche en même temps la plus faible valeur de EAI ; cela provient seulement du fait que la coalescence est susceptible de se produire plus rapidement lorsque l'activité émulsifiante (EAI) est plus élevée : en effet, la présence d'un nombre plus important de gouttelettes de matière grasse formées augmente la probabilité de coalescence et donc réduit la stabilité relative de l'émulsion. Des résultats similaires ont déjà été décrits par Dickinson et Stainsby, (1982). Nos résultats confirment donc que le PCPB présente un grand intérêt puisqu'il pourrait être utilisé comme agent émulsifiant, notamment dans les produits carnés. On notera également que les EAI et ESI du PCPB sont semblables à ceux obtenus lorsque la microfiltration a été utilisée pour la purification des protéines de poumon de bœuf (perméat), ce qui diffère sensiblement des résultats obtenus précédemment pour les propriétés gélifiantes.

En conclusion, les valeurs de EC, EAI et ESI du PCPB confirment la possibilité d'utiliser ce concentré comme agent émulsifiant dans des applications industrielles. En revanche, nous n'avons pas pu établir de corrélation statistique entre la solubilité, les tensions de surface et interfaciale, l'hydrophobicité de surface, EC, EAI et ESI pour les différents types d'ingrédients protéiques comparés dans ce travail, bien qu'une situation similaire ait déjà été rapportée dans la littérature (Molina et al, 2001).

Dans le cas du PCPB, il semble que sa solubilité et son EAI élevés, de même que la diminution rapide de la tension interfaciale au cours du temps, puissent être attribués à la présence de protéines de faibles masses moléculaires observées précédemment par GPC sur la figure IV.8 et qui ne sont pas présentes dans tous les autres ingrédients. Une autre explication possible réside dans la grande affinité de certaines protéines du PCPB avec les lipides que traduit sa forte hydrophobicité de surface. D'un point de vue pratique, cette affinité peut cependant devenir un problème si un dégraissage préalable de ces protéines est nécessaire (Arjomaa et Hallman, 1988), comme pour la VSM, parce qu'il pourrait réduire à la fois le rendement de récupération des protéines et les propriétés techno-fonctionnelles du PCPB (Bastos et al, 1990).

Tableau IV.5 : Capacité émulsifiante, indice d'activité émulsifiante (EAI), stabilité émulsifiante (ESI), pouvoir moussant (FA) et stabilité moussante (FS) du PCPB, des protéines issues de MF et des protéines commerciales.

Type de protéines	EC (mL/g)	EAI (m ² .g ⁻¹)	ESI (min)	FA (%)	FS (min)
PCPB	320±20	90±20	17±2	46±3	80±2
Protéines issues de la MF	-	85±5	18±5	47±3	60±4
Lactosérum	306±5	42±2	33±2	74±2	61±3
Blanc d'œuf	263±10	51±6	18±3	42±3	237±4
Isolat de soja	362±7	48±8	17±2	18±3	60±2
Na-CN	400±12	56±4	15±2	45±3	19±4

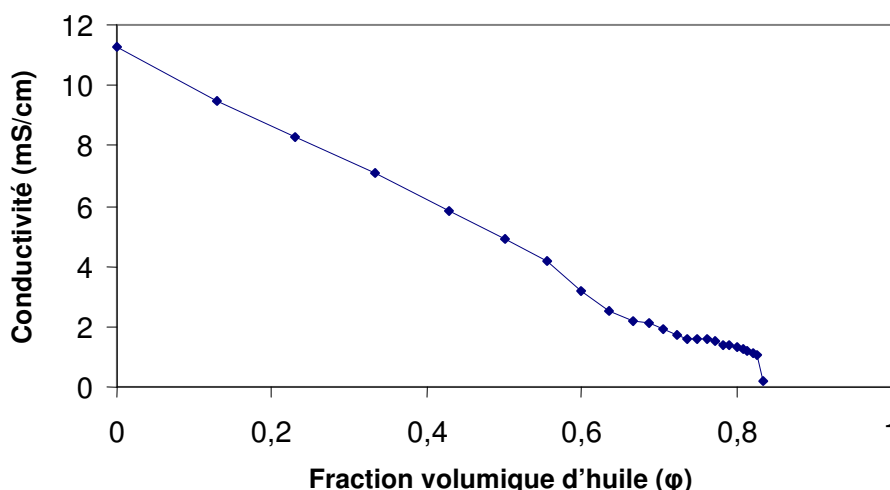


Figure IV.14 : Évolution de la conductivité d'une émulsion de PCPB en fonction de la fraction volumique d'huile (ϕ).

IV.3.3 Propriétés moussantes

Les valeurs du pouvoir moussant (FA) et de la stabilité (FS) mesurées pour le PCPB, les protéines issues de MF et les ingrédients commerciaux sont résumées dans le tableau IV.5. Dans ce tableau, on note que les résultats obtenus pour le PCPB sont proches de ceux des protéines issues de MF, ce qui confirme que la précipitation au pI et les membranes conduisent à des concentrés de protéines ayant les mêmes propriétés moussantes, ce qui est en accord avec les résultats sur les propriétés émulsifiantes. Ce tableau montre également que la capacité moussante (FA) du PCPB est inférieure à celle des protéines de lactosérum, semblable statistiquement à celles de Na-CN et des protéines de blanc d'œuf, mais beaucoup plus élevée que celle de l'isolat de soja. Inversement, la stabilité moussante (FS) du PCPB est plus élevée que celle de tous les ingrédients commerciaux, sauf les protéines de blanc d'œuf qui ont donné les mousses les plus stables, comme attendu. En conséquence, le PCPB semble être un bon agent moussant, la différence entre les propriétés moussantes et émulsifiantes de la section IV.3.2 pouvant être liée au fait que la grande affinité entre les lipides et les PCPB disparaît lorsque l'huile est remplacée par l'air.

Toutefois, la capacité des protéines à former et stabiliser une mousse est une propriété techno-fonctionnelle qui joue un rôle ambigu. Même si les aliments foisonnés ont un grand intérêt pour les transformateurs de produits alimentaires (Campbell et Mougeot, 1999), les tonnages de produits carnés foisonnés restent assez faibles en comparaison par exemple avec les mousses laitières, de même que les besoins en agents moussants dans ces produits, même s'ils ont tendance à se développer ces dernières années sous la forme de produits carnés

allégés. En revanche, la tendance à mousser des protéines est un inconvénient dans tous les autres cas, par exemple lors de l'opération d'émulsification. En conséquence, les valeurs de EC, EAI, ESI, FA et FS du PCPB montrent sans aucun doute que les protéines de PCPB présentent les propriétés d'un bon agent émulsifiant qui pourrait avantageusement remplacer les Na-CN et les isolats de protéines de soja, même dans des émulsions concentrés à base de viande, mais au prix d'une tendance accrue au moussage lorsqu'elles sont soumises à des cisaillements élevés.

IV.3.4 Pouvoir de rétention d'eau (PRE)

Il est bien connu que la conformation d'une protéine en solution dépend largement de ses interactions avec l'eau. Tous les ingrédients protéiques sous forme de poudres doivent être réhydratés lors de leur utilisation dans les aliments élaborés. C'est pour cette raison que les propriétés d'hydratation des protéines de PCPB ont été étudiées et qu'elles sont d'un grand intérêt pratique. Le tableau IV.6 présente le pouvoir de rétention d'eau du PCPB et des ingrédients commerciaux. D'après ce tableau, il est clair que le PCPB a le pouvoir de rétention d'eau le plus élevé, en comparaison avec les ingrédients commerciaux. Cela est en ligne avec les bonnes propriétés gélifiantes du PCPB (section IV.4.1) : en effet, la gélification implique la formation d'une masse insoluble fortement hydratée dans laquelle la capacité du PCPB à retenir l'eau est un facteur essentiel, au même titre que les interactions protéines-protéines.

Tableau IV.6 : Pouvoir de rétention d'eau (PRE) pour le PCPB et les ingrédients commerciaux.

Type de protéines	PRE (mL eau/g protéine)
PCPB	11,6±1,25
Lactosérum	0,80±0,2
Blanc d'œuf	1,50±0,4
Isolat de soja	3,40±0,6
Na-CN	0,72±0,1

IV.4 Émulsification en continu sur l'unité rotor/stator : influence combinée de la formulation et des conditions opératoires

L'objectif principal de cette partie de notre travail est d'étudier la capacité du PCPB à former une émulsion dans des conditions qui correspondent à la réalité de la pratique

industrielle. Il s'agit de vérifier si ces protéines sont toujours capables de former une émulsion en présence d'autres ingrédients, notamment des agents épaississants, et ensuite de déterminer les conditions nécessaires (notamment la durée et l'intensité du mélange) à la réalisation de cette opération. Nous avons choisi le xanthane comme agent épaississant et nous avons décidé de réaliser cette opération en continu sur le dispositif RS dont le principe de fonctionnement a été décrit dans le chapitre II. Cette unité nous a permis d'analyser les influences respectives de la vitesse d'agitation et du temps de séjour. L'influence de ce dernier paramètre a été étudiée en agissant sur les débits des deux phases, huile et phase aqueuse. Pour réaliser cette étude, un plan factoriel à deux paramètres 2^2 a été utilisé dans un premier temps afin d'analyser les effets des variables de la formulation (les concentrations en PCPB et en xanthane) sur la tension de surface et la rhéologie de la phase continue. Les compositions en PCPB et en xanthane utilisées dans ce chapitre ont été données précédemment (tableau II.2). Pour étudier l'influence combinée de la formulation et des conditions opératoires sur les caractéristiques de l'émulsion (taille des gouttelettes, propriétés rhéologique et stabilité), nous avons utilisé un plan d'expériences à quatre facteurs de type « split-plot » : il s'agit d'un outil adapté à l'étude de l'effet combiné de plusieurs paramètres lorsque, au moins l'un d'eux, est considéré comme « difficile à changer », ce qui est le cas dans notre étude, comme nous le verrons plus loin. Nous rappellerons que les principes régissant les plans d'expériences de type « split-plot », ainsi que les paramètres qui ont fait l'objet de ce plan, ont déjà été décrits dans le chapitre II (section II.6.3). Enfin, la capacité du PCPB à former une émulsion en continu sera également comparée avec celle des caséinates de sodium (Na-CN), qui sont considérés comme un agent émulsifiant de référence.

IV.4.1 Interactions protéines-polysaccharides : effet sur les propriétés rhéologiques et interfaciales de la phase aqueuse

Les propriétés rhéologiques et les tensions interfaciales σ des cinq formulations utilisées dans le plan factoriel 2^2 sont résumées dans le tableau IV.7. Les valeurs de σ mentionnées dans ce tableau ont été obtenues 2,5 min après le début de chaque essai : on rappellera que ces valeurs restent proches à celles mesurées après 10 min (figure IV.15). A partir de ces données, nous avons effectué une analyse de la variance (ANOVA) dont le résultat est résumé dans le tableau IV.8a. Le modèle a été réduit à l'effet des facteurs principaux (X1 et X2) en négligeant leur interaction (X1.X2). Les résultats montrent que ces deux effets traduisent bien l'évolution de la réponse ($R^2=0,79$ et $p=0,075$ pour le test de défaut d'ajustement). L'ANOVA

confirme également que seules les protéines (X1) influencent de façon significative la tension de surface : l'augmentation de la quantité de PCPB provoque la diminution de σ . Ce résultat était cependant prévisible compte tenu du caractère émulsifiant du PCPB. A l'inverse, il semble que le xanthane joue un rôle contraire à celui des protéines, c'est-à-dire que l'augmentation de la concentration en xanthane accroît la tension de surface. Cet effet apparaît également sur les cinétiques d'évolution de σ au cours du temps et il est particulièrement marqué aux temps courts : il semble que l'augmentation de la viscosité due à la présence du xanthane retarde la diffusion des protéines vers l'interface.

L'étude rhéologique a montré le caractère rhéofluidifiant des formulations, avec un indice d'écoulement n entre 0,24 et 0,37 (tableau IV.7). Les valeurs de viscosité apparente calculées à des gradients de vitesses de 10 s^{-1} , 100 s^{-1} et 600 s^{-1} (figure IV.16), ainsi que les valeurs de k ont été soumises à une ANOVA. Les résultats montrent que les logarithmes de ces réponses sont mieux représentés par un modèle linéaire que les réponses elles-mêmes. Nous avons donc présenté une table d'ANOVA de $\text{Log}(k)$ dans le tableau IV.8b. On remarque que l'accord entre les données expérimentales et le modèle choisi est remarquable ($R^2=0,976$ et $p=0,3$ pour test de défaut d'ajustement). Les résultats montrent que $\text{Log}(k)$ ainsi que les $\text{Log}(\mu)$ varient linéairement avec les facteurs X1 et X2. Il semble également que l'effet de xanthane est plus important que celui des protéines, bien que l'effet des protéines reste du même ordre de grandeur. En revanche, la table d'ANOVA pour n (tableau IV.8c) montre que seul le xanthane a un effet significatif. Dans ce cas, le modèle linéaire explique également de manière satisfaisante la réponse ($R^2=0,92$ et $p=0,848$ pour le test de défaut d'ajustement avec le modèle réduit). n diminue lorsque X2 augmente, vraisemblablement en raison de l'augmentation du comportement rhéofluidifiant de la formulation avec la quantité de xanthane.

Tableau IV.7: Tension interfaciale et paramètres rhéologiques des phases aqueuses du plan factoriel en fonction de leur composition.

X_1^*	X_2^*	$\sigma \text{ (mN/m)}$	n	$k \text{ (Pa.s}^n\text{)}$
0	0	15,6	0,30	1,80
-1	-1	14,9	0,32	0,75
-1	1	16,9	0,28	1,65
1	-1	8,5	0,37	1,55
1	1	12,9	0,24	5,00

voir chapitre II (II.6.1)

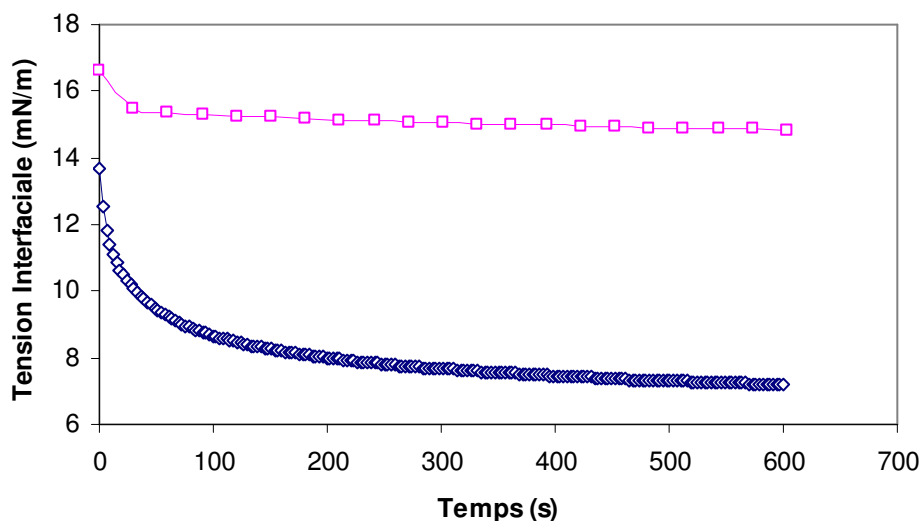


Figure IV.15: Évolution dynamique de la tension interfaciale :
(◇) PCPB et (□) Na-CN pour la phase aqueuse suivante ($X_1=1$; $X_2=-1$).

Tableau IV.8 : Table d'ANOVA des propriétés des phases aqueuses contenant du PCPB : DF (degré de liberté), F (Fisher ratio), (*) mesure le niveau de signification de l'effet; les signes (-) et (+) montrent le sens de l'effet du facteur sur la réponse.

(a) σ

(a) Source	Somme des carrés	DF	F	p
X_1	27,51	1	63,18	0,016* (-)
X_2	9,95	1	22,86	0,0411* (+)
X_1X_2	1,53	1	3,10	0,202
Défaut d'ajustement	9,30	1	21,36	0,045 (0,075) ⁽¹⁾
Erreur pure	0,87	2		
Total	49,16	6		

⁽¹⁾ La p-valeur est de 0,045 lorsque l'effet X_1X_2 est pris en compte ; elle est de 0,075 lorsque l'interaction qui n'est pas statistiquement significative ($p>0,2$) est exclue du modèle.

(b) Log (k)

(a) Source	Somme des carrés	DF	F	p
X_1	0,931	1	237,7	0,004** (+)
X_2	1,394	1	355,8	0,003** (+)
X_1X_2	0,041	1	10,4	0,084
Défaut d'ajustement	0,007	1	1,9	0,300
Erreur pure	0,008	2		
Total	2,382	6		

(c) n

(c) Source	Somme des carrés	DF	F	p
X_1	0,000225	1	0,36	0,612
X_2	0,013225	1	20,88	0,045* (-)
X_1X_2	0,002025	1	3,20	0,216
Défaut d'ajustement	0,000030	1	0,05	0,848
Erreur pure	0,001267	2		
Total	0,016771	6		

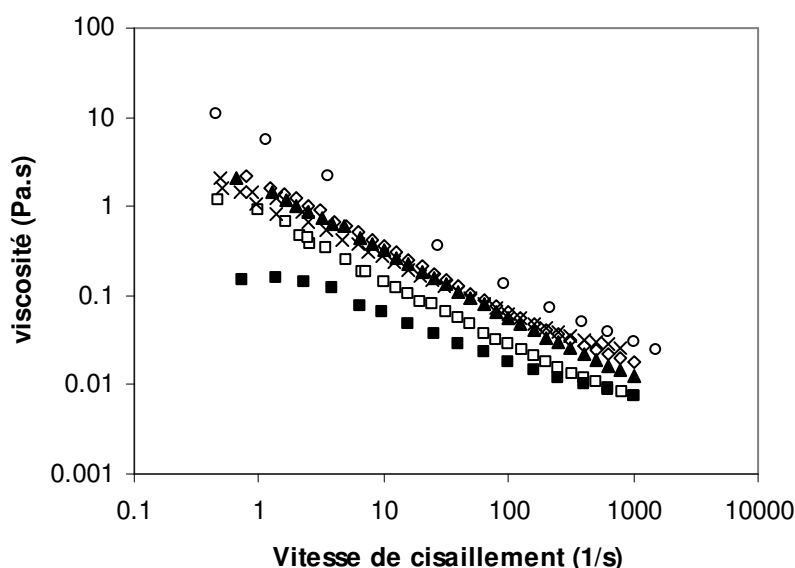


Figure IV.16: Viscosité des phases aqueuses contenant du PCPB ou des Na-CN en fonction de la vitesse de cisaillement : \diamond ($X_1=0$; $X_2=0$), \square ($X_1=-1$; $X_2=-1$), \blacktriangle ($X_1=-1$; $X_2=1$), \times ($X_1=1$; $X_2=-1$), \circ ($X_1=1$; $X_2=1$) et \blacksquare Na-CN ($X_1=1$; $X_2=-1$).

IV.4.2 Analyse des résultats de l'émulsification en continu

Les résultats expérimentaux des 28 essais sont résumés dans le tableau IV.9 ; celui-ci contient les valeurs de d_{32} , k , n et de la stabilité des émulsions après 24 heures en fonction des facteurs X_i .

Qualitativement, le tableau IV.9 montre que le diamètre de Sauter varie entre 60 et 300 μm , essentiellement à cause des facteurs correspondant aux conditions opératoires (vitesse d'agitation et temps de séjour). Il montre également, même si cela n'apparaît pas directement à partir des valeurs k et n , que les émulsions sont généralement plus visqueuses que leur phase continue correspondante, bien qu'une comparaison entre les valeurs des tableaux IV.7 et IV.9 montre que les phases continues et les émulsions présentent toutes deux un comportement rhéofluidifiant. Enfin, le tableau IV.9 montre aussi que la stabilité des émulsions semble être très dépendante de la formulation.

Tableau IV.9. Résultats du plan expérimental de type split-plot : propriétés des émulsions

Préparation	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	d ₃₂ (µm)	n	k (Pa.s ⁿ)	Quantité d'huile séparée après 24h (mL)
1	-1	-1	-1	-1	250	0,39	0,45	7,5
	-1	-1	-1	1	290	0,30	0,99	19
	-1	-1	1	-1	140	0,29	0,71	20
	-1	-1	1	1	100	0,33	0,94	11
2	-1	1	-1	-1	290	0,25	2,3	2,0
	-1	1	-1	1	280	0,28	1,82	5,0
	-1	1	1	-1	130	0,27	2,19	1,0
	-1	1	1	1	110	0,26	2,24	3,0
3	1	-1	-1	-1	300	0,43	1,19	3,6
	1	-1	-1	1	210	0,43	1,25	17
	1	-1	1	-1	110	0,44	1,07	4,0
	1	-1	1	1	60	0,45	1,15	5,0
4	1	1	-1	-1	270	0,29	4,54	0,5
	1	1	-1	1	160	0,26	4,24	0,3
	1	1	1	-1	80	0,26	5,10	0,2
	1	1	1	1	80	0,29	4,97	0,0
5	0	0	0	0	120	0,32	1,83	1,6
	0	0	0	0	130	0,33	1,50	1,5
	0	0	0	0	140	0,29	2,16	1,4
	0	0	0	0	160	0,30	1,91	1,5
6	0	0	0	0	100	0,33	1,39	2,1
	0	0	0	0	130	0,33	1,56	2,0
	0	0	0	0	130	0,33	1,51	1,9
	0	0	0	0	160	0,31	1,64	2,0
7	0	0	0	0	120	0,34	1,38	1,9
	0	0	0	0	130	0,35	1,26	1,7
	0	0	0	0	130	0,36	1,20	1,8
	0	0	0	0	150	0,36	1,31	1,8

L'analyse quantitative du plan expérimental étudié est résumée dans le tableau IV.10. Pour chacune des variables dépendantes (n , k , d_{32} , stabilité), nous avons uniquement mentionné les facteurs qui ont un effet significatif sur la réponse, c'est-à-dire une p-valeur inférieure à 0,05 lors de l'ANOVA. On rappellera que cette dernière suppose que le plan « split-plot » peut être décrit par un modèle linéaire à deux niveaux d'erreur : c'est pour cette raison que le tableau distingue les effets significatifs selon qu'ils appartiennent au « whole-plot » ou au « sub-plot ». On rappellera aussi que plus les valeurs de p associés au « whole-plot » ou au « sub-plot » sont élevées, plus le défaut d'ajustement est faible et plus le modèle est significatif, alors qu'au contraire, plus les valeurs de p associées à l'influence des facteurs sont faibles, plus le facteur a un effet significatif sur la variable dépendante.

Tableau IV.10 : Table d'ANOVA du plan « split-plot » sur les paramètres : Log (d_{32}), Log (k), n et Log(mL d'huile) séparée après 24h ; les signes (–) et (+) montrent le sens de l'effet des facteurs sur les réponses ; les p-valeurs au niveau des « plots » correspondent au test de défaut d'ajustement, alors que les p-valeurs sur les facteurs montrent le niveau de signification de leurs effets.

Log(d_{32}) : $R^2=84,2\%$			Log(k) : $R^2=84,8\%$		
Whole plot p>6%	X ₁	0,04 –	Whole plot p>30%	X ₁	0,009 +
				X ₂	$6,10^{-4}$ +
Sub-plot p>30%	X ₃	$<10^{-4}$ –	Sub-plot p>20%	n'est pas significatif	
	X ₄	0,015 –			

n : $R^2=54,4\%$			Log(mL huile) : $R^2=87,0\%$		
Whole plot*** p>60%	X ₂	0,046 –	Whole plot* p>9%	X ₁	0,007 –
				X ₂	0,003 –
				X ₁ X ₂	0,03 –
Sub-plot p>50%	n'est pas significatif		Sub-plot P<5%	X ₃	0,02 –

Sur d_{32} , nous avons tout d'abord constaté qu'un modèle fondé sur Log(d_{32}) améliore la modélisation linéaire. Le tableau IV.10 confirme clairement que d_{32} dépend essentiellement des facteurs du sub-plot, donc des paramètres de procédé. Il semble que la vitesse d'agitation X₃ est le paramètre clé qui régit la réduction de taille des gouttelettes. L'augmentation de la vitesse d'agitation diminue nettement d_{32} , alors que les deux autres facteurs qui ont un effet significatif (le temps de séjour et la concentration en PCPB) jouent un rôle moins important sur ce paramètre, mais qui contribue également à la diminution de d_{32} . Ainsi, l'augmentation du temps de séjour par la diminution simultanée et dans la même proportion des débits de deux phases augmente la durée du traitement mécanique appliqué à la phase dispersée, ce qui semble favoriser la rupture des gouttelettes d'huile (McClements, 1999). De même, il semble que l'augmentation de la teneur en protéines accélère la cinétique de stabilisation des nouvelles gouttelettes formées par la rupture des interfaces liquide/liquide. En revanche, on retiendra que le xanthane ne joue aucun rôle significatif sur d_{32} . Nous avons également constaté que les émulsions obtenues avec le PCPB présentent toujours une distribution des tailles des gouttelettes assez semblable à une loi de distribution log-normale (figure IV.17). Les distributions des tailles présentent également une auto-similitude, car la valeur du rapport s_0/d_{32} (où s_0 est l'écart-type sur la taille des gouttelettes) reste constante vers 0,37 quel que soit d_{32} (figure IV.18). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus précédemment sur les mousses produites en continu par Labbafi et al (2007) qui avaient utilisé le même dispositif que dans ce travail. Ces auteurs avaient constaté que l'écart-type sur la taille des bulles s_0 variait selon

la relation $s_0=0,26 \cdot d_{32}^{1,06}$, mais une relation linéaire peut aussi être établie à partir de leurs données avec $s_0=0,34 \cdot d_{32}$ ($R^2=0,99$), ce qui est en accord avec nos propres résultats (figure IV.18). En conclusion, ce résultat quantitatif montre l'analogie qui existe entre les propriétés des mousses et des émulsions formées en continu par agitation mécanique avec un dispositif de type RS.

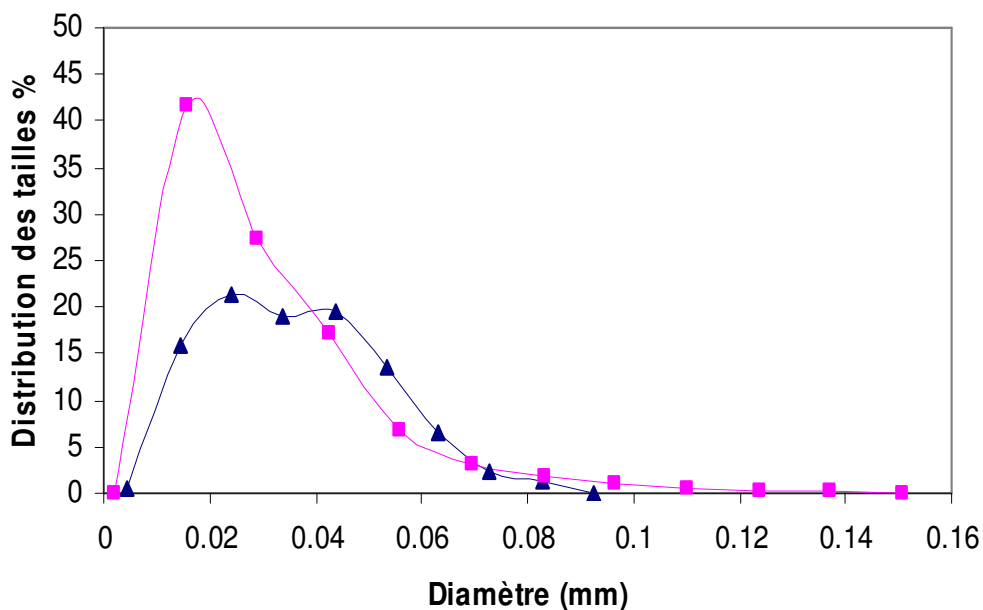


Figure IV.17: Comparaison des distributions des tailles des gouttelettes avec (■) BLCP et (▲) Na-CN, pour une émulsion préparée dans les conditions $X_1=1$, $X_2=-1$, et $X_3=1$, $X_4=1$

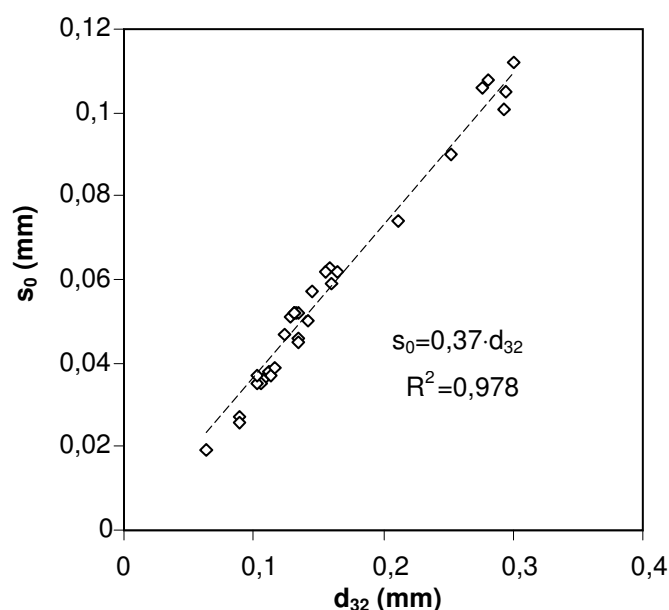


Figure IV.18. Relation entre l'écart-type s_0 et le diamètre de Sauter d_{32} .

L'influence des facteurs sur les paramètres rhéologiques (n , k) des émulsions peut également être analysée en utilisant des modèles linéaires entre $\text{Log}(k)$ ou n et les facteurs du plan d'expériences. Comme le montre le tableau IV.10, contrairement à d_{32} , la viscosité de l'émulsion dépend exclusivement des variables de formulation. Cela apparaît clairement sur les résultats de $\text{Log}(k)$: l'augmentation des concentrations en PCPB et en xanthane contribue à accroître la consistance de l'émulsion. En revanche, l'effet du facteur X2 (xanthane), le seul qui semble susceptible d'avoir une influence sur n , reste faible (p-valeur proche de 5%) avec un coefficient R^2 qui avoisine 0,54, alors qu'il est de plus de 80% pour les autres variables. Ce résultat montre que la variabilité de n est probablement trop complexe pour être décrite par un simple modèle linéaire. Selon McClements (1999), la viscosité d'une émulsion est directement liée à la viscosité de la phase continue et toute modification des propriétés rhéologiques de la phase continue va nécessairement affecter la rhéologie de l'émulsion. Ceci est clairement démontré sur la figure IV.19 qui met en évidence la corrélation linéaire entre la viscosité des émulsions et celles de leurs phases continues correspondantes à une vitesse de cisaillement de 100 s^{-1} . Le coefficient de corrélation entre ces deux grandeurs est de 89% environ, ce qui est en accord avec le tableau d'ANOVA de $\text{Log}(k)$ et confirme quantitativement que seules les variables de formulation jouent un rôle sur les paramètres rhéologiques de l'émulsion, probablement parce que la variation de taille des gouttelettes reste dans une gamme trop étroite pour avoir un effet significatif.

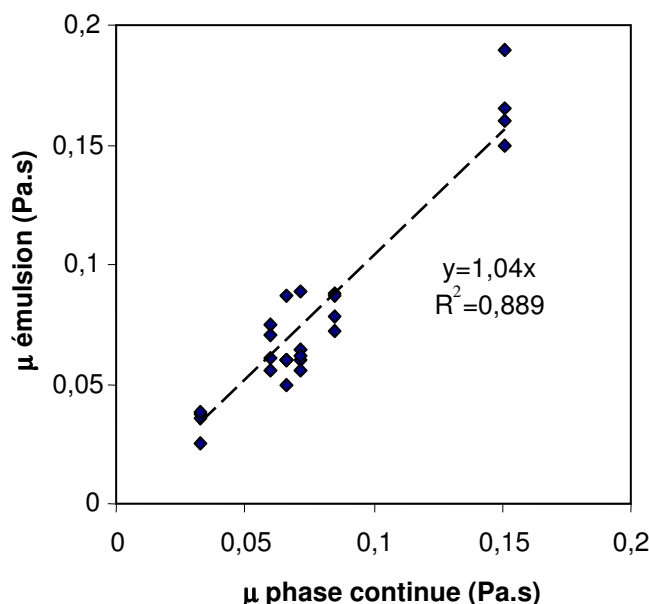


Figure IV.19. Corrélation entre la viscosité (μ) des émulsions (PCPB) et celle de leurs phases continues respectives à 100 s^{-1} .

Enfin, la quantité d'huile séparée après 24 heures peut aussi être décrite par un modèle linéaire après transformation en logarithme de la variable dépendante (tableau IV.10). Contrairement à la viscosité de l'émulsion qui est influencée uniquement par la formulation, et au d_{32} qui est essentiellement modifié par les variables de procédé, la stabilité de l'émulsion dépend vraiment de l'effet combiné de la formulation et des variables de procédé, même s'il semble que les facteurs principaux de formulation ($X1$ et $X2$) ainsi que leurs interactions ($X1 \cdot X2$) contribuent davantage à la stabilisation de l'émulsion en ralentissant la séparation d'huile. Toutefois, la stabilité de l'émulsion augmente, i.e. la séparation diminue, quand on accroît la vitesse d'agitation $X3$, ce qui peut être attribué à la diminution de d_{32} qui résulte de l'augmentation de $X3$. En effet, selon la loi de Stokes, la stabilité d'une émulsion augmente lorsque la viscosité de la phase continue augmente, en accord avec les effets de $X1$ et $X2$, mais aussi lorsque le diamètre des gouttelettes diminue (McClements, 1999), ce qui correspond à l'effet principal de $X3$ dans le tableau IV.10. Toutefois, l'influence de ce facteur sur la stabilité est réduite par le fait que la variation de d_{32} reste limitée dans ce travail. Cela explique également pourquoi l'augmentation du temps de séjour, qui devrait avoir en principe un effet similaire mais plus faible, ne semble pas influencer la stabilité de l'émulsion (tableau IV.10).

En conclusion, l'analyse du plan d'expériences utilisé dans ce travail confirme que les propriétés des émulsions dépendent à la fois de la formulation et des conditions opératoires.

Les variables de procédé, en particulier la vitesse d'agitation, contrôlent la réduction de taille des bulles, donc le diamètre moyen de Sauter d_{32} et s_0 . Quant aux variables de formulation, telles que les teneurs en protéines et en xanthane, elles gouvernent la texture de l'émulsion. Enfin, on retiendra que la stabilité de l'émulsion peut être améliorée en agissant à la fois sur la formulation et sur la vitesse d'agitation.

IV.4.3 Comparaison entre les émulsions préparées avec le PCPB et Na-CN

A titre de comparaison, nous avons réalisé une émulsification en continu sur l'unité RS en utilisant en lieu et place du PCPB les caséinates de sodium (Na-CN) qui sont généralement utilisés dans les produits carnés en qualité d'agent émulsifiant. Il s'agit donc de comparer les performances du PCPB et des Na-CN avec les mêmes conditions opératoires sur une seule et même formulation contenant une quantité identique de chacun de ces deux ingrédients protéiques. Notons que comme nous l'avons montré précédemment, le PCPB présente une hydrophobicité de surface et une activité émulsifiante plus importantes que les Na-CN, mais avec une stabilité d'émulsion comparable. Une autre différence entre le PCPB et les Na-CN est que le second ingrédient est constitué d'un mélange de protéines de structures et de propriétés similaires, alors que le PCPB contient un mélange de protéines avec un spectre de poids moléculaires très large (de 15 kDa à 500 kDa). On retiendra cependant que les deux ingrédients ont des solubilités similaires à pH 9 et sont tous deux peu solubles à pH 4. Pour cette comparaison, la formulation (X1=1; X2=-1) a été sélectionnée, c'est-à-dire celle qui contient 3% p/p de protéines et 0,1% p/p de xanthane. Le choix de cette formulation a été dicté par son comportement à l'émulsification par rapport aux conditions opératoires pour le PCPB. En effet, cette formulation s'est montrée très sensible aux conditions opératoires avec le PCPB comme agent émulsifiant (la vitesse d'agitation et le temps de séjour) : c'est avec cette formulation que la plus grande et la plus petite valeur de d_{32} ont été obtenues (tableau IV.9).

Les résultats concernant la tension interfaciale ont déjà été présentés sur la figure IV.15. On constate que le PCPB réduit la tension interfaciale à environ 8,4 mN/m, alors que la valeur obtenue pour les Na-CN est de 15,4 mN/m 2,5 min après le début de la mesure. La faible valeur de σ pour le PCPB peut être expliquée par son hydrophobicité de surface élevée et sa solubilité limitée (70%) à pH 7 (IV.3.1). La figure IV.15 montre également que la cinétique de diminution de la tension interfaciale est plus lente pour le PCPB que pour les Na-CN. Ce comportement peut être expliqué par la très grande solubilité des Na-CN à pH 7 (Cheftel et al,

1985). Une autre raison possible est la diffusion plus lente à l'interface des protéines de PCPB résultant de la viscosité élevée de la phase continue contenant le PCPB. En effet, comme l'a montré la figure IV.16, la substitution du PCPB par les Na-CN conduit à une viscosité apparente plus faible, quelle que soit la contrainte de cisaillement appliquée. En conséquence, le comportement rhéofluidifiant de la matière première contenant les Na-CN peut être modélisé par une loi-puissance avec $n=0,53$ et $k=0,17 \text{ Pa.s}^{0,53}$, ce qui diffère significativement des valeurs rapportées dans le tableau IV.7 pour le PCPB.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous avons utilisé les mêmes conditions opératoires pour comparer les performances à l'émulsification de ces deux protéines ; ces conditions sont : $X_3=X_4=-1$ et $X_3=X_4=1$. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.11. Ils montrent que comme dans le cas du PCPB, les paramètres de procédé contrôlent la réduction de taille des gouttelettes : le diamètre moyen des gouttelettes est plus petit lorsque l'on utilise les Na-CN à la place du PCPB, mais avec une faible différence. Cela provient probablement de la plus faible viscosité de la phase continue avec les Na-CN. En effet, dans un dispositif de type RS, une faible viscosité de la phase continue favorise, en principe, l'effet de la turbulence sur la rupture des gouttelettes (Walstra, 1993). Toutefois, la figure IV.17 montre aussi que bien que la distribution des tailles en présence de Na-CN semble plus large qu'avec le PCPB, la présence de gouttelettes de plus grandes tailles en faible quantité dans les émulsions préparées avec PCPB se traduit par un d_{32} un peu plus élevé dans ces émulsions. Ceci a été confirmé par la figure IV.20 qui montre aussi que la distribution des tailles semble moins uniforme dans les émulsions à base de PCPB que pour les Na-CN.

Tableau IV.11 : Comparaison entre les propriétés des émulsions à base de PCPB et de Na-CN $X_1=1$ et $X_2=-1$.

Protéines	X_3	X_4	d_{32} (mm)	n	k (Pa.s ⁿ)	Quantité d'huile séparée après 24h (mL)
PCPB	-1	-1	0,30	0,43	1,19	3,6
	1	1	0,06	0,45	1,15	5,0
Na-CN	-1	-1	0,09	0,49	0,36	3,5
	1	1	0,05	0,64	0,18	5,0

Comme pour le PCPB, l'émulsion à base de Na-CN est toujours plus visqueuse que la phase continue qui a servi à sa préparation. Cependant, les émulsions à base de Na-CN restent beaucoup moins visqueuses que celles préparées avec le PCPB (figure IV.21). Ce résultat confirme la relation entre la viscosité de la phase continue et celle de l'émulsion

correspondante (figure IV.19). Une conséquence attendue est que la stabilité des émulsions diminue lorsque les Na-CN sont utilisés à la place du PCPB. Ce résultat est confirmé par la figure IV.22 qui montre que, à court-terme, les émulsions à base de Na-CN sont moins stables. En effet, la cinétique de crémage gravitaire des gouttes est fortement liée à la viscosité de la phase continue et dans notre cas, la diminution de la viscosité n'est pas été contrebalancée par la diminution observée du diamètre des gouttelettes lorsqu'on utilise Na-CN dans la formulation.

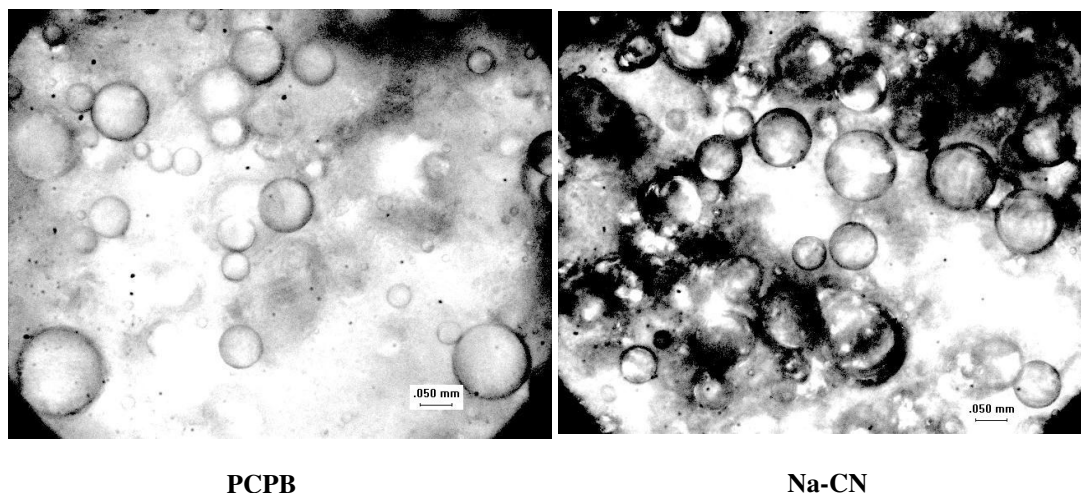


Figure IV.20: Micrographes des gouttelettes d'huile dans les deux émulsions avec ($X_1=1$; $X_2=-1$; $X_3=1$; $X_4=1$).

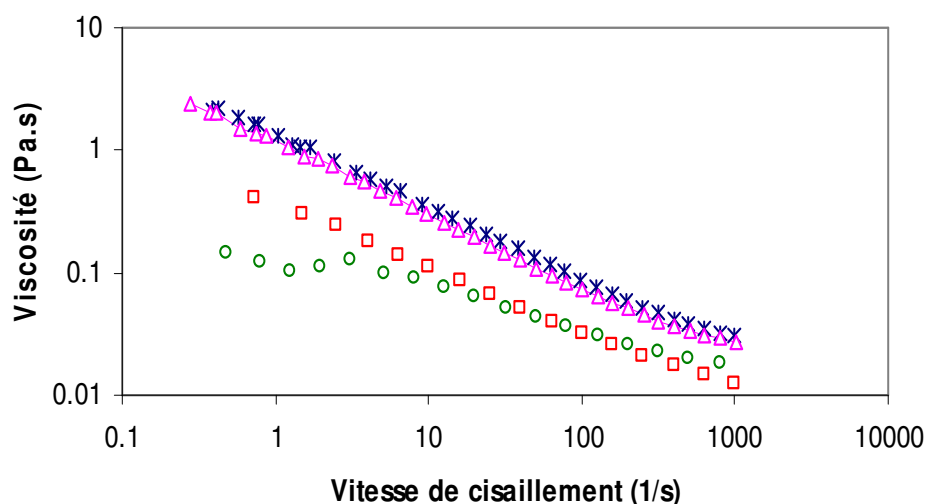


Figure IV.21 : Évolution de la viscosité apparente des émulsions en fonction du gradient de vitesse : * PCPB et \square Na-CN ($X_3=1, X_4=1$) ; \triangle PCPB et \square Na-CN ($X_3=-1, X_4=-1$).

On notera toutefois que la stabilité à 24h des émulsions reste similaire pour les deux types de protéines (tableau IV.11), ce qui montre que ces effets semblent s'atténuer à long terme. Cependant, bien que la stabilité à 24h soit la même pour les deux émulsions brutes, on a observé au contraire qu'après passage à l'homogénéisateur hautes pression à 200 bars (APV-2000, APV, France), les émulsions contenant du PCPB ont toujours présenté une stabilité parfaite (i.e. sans crémage apparent) pendant plusieurs semaines, tandis qu'une séparation totale des deux phases a été observée sur toutes les émulsions stabilisées par les Na-CN après une semaine environ.

En fin de compte, les résultats obtenus dans cette partie confirment que le PCPB peut être considéré comme un agent émulsifiant présentant des performances comparables, voire meilleures, que celles des caséinates de sodium. En effet, le PCPB peut être utilisé pour l'émulsification, non seulement (comme nous l'avions déjà montré) pour les préparations en batch, mais aussi pour la production d'émulsions en continu. Le principal inconvénient résultant de l'utilisation de PCPB est l'augmentation de viscosité de la phase continue que cet ingrédient induit, par exemple par rapport aux Na-CN. Sa conséquence est que les diamètres moyens des gouttelettes obtenues sont plus grands avec le PCPB, bien que cela soit compensé par une diminution de la tendance de l'émulsion à crémer rapidement.

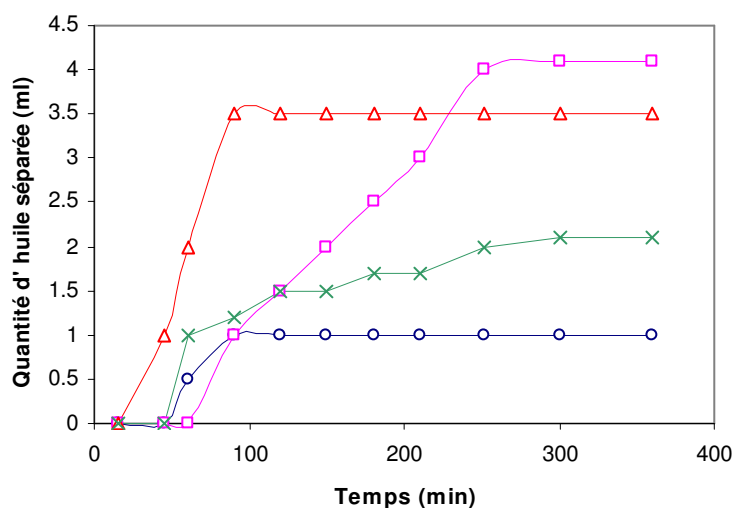


Figure IV.22: Quantité d'huile séparée des émulsions en fonction de temps :
 ■ PCPB et ■ Na-CN ($X_3=1$, $X_4=1$) ; × PCPB et ▲ Na-CN ($X_3=-1$, $X_4=-1$).

IV.4.4 Conclusions

En conclusion, malgré un nombre important de paramètres liés à la fois aux choix de formulation et aux conditions opératoires, leur influence combinée sur une opération d'émulsification en continu a pu être étudiée et mieux comprise grâce à l'utilisation d'un plan d'expériences adapté. Dans notre travail, nous avons utilisé un plan « split-plot » à quatre facteurs, les deux du « whole-plot » étant liés à la formulation (teneurs en protéines et en xanthane) et les deux du « sub-plot » restant liés aux conditions opératoires (vitesse d'agitation et temps de séjour), ce qui nous a permis de réduire le nombre de préparations de phase continue de 28 à 7 et a diminué en conséquence la quantité de protéines de poumon de bœuf à extraire pour réaliser les essais.

Les résultats expérimentaux ont montré que la taille des gouttelettes est déterminée par les paramètres de procédé, en particulier par la vitesse d'agitation, alors que la stabilité de l'émulsion dépend à la fois des paramètres de formulation et de procédé. Un résultat qui mérite également d'être signalé est que les émulsions à base de PCPB obtenues sur le système RS ont toujours présenté des distributions de tailles de gouttes monomodales et auto-similaires, c'est-à-dire que le rapport entre l'écart-type et le diamètre moyen de la distribution de taille des gouttelettes est constant, à environ 0,37, indépendamment de la formulation et des conditions opératoires appliquées. Ce résultat est proche de celui obtenu précédemment sur les distributions de tailles de bulles dans des mousses laitières préparées avec le même dispositif. Ce résultat ouvre donc la voie vers une généralisation de cette relation à d'autres formulations destinées à l'émulsification dans ce même dispositif rotor-stator.

D'un point de vue formulation, signalons enfin que la bonne performance du PCPB en émulsification en présence d'agents texturants montre la capacité de ces protéines à se substituer à d'autres types de protéines dans les préparations alimentaires. Le remplacement des Na-CN par le PCPB induit cependant une viscosité plus élevée avec un comportement rhéofluidifiant plus prononcé en présence de PCPB dont il faut tenir compte au niveau du procédé. Toutefois, on notera que si la viscosité plus élevée joue un rôle défavorable sur la réduction de taille des gouttelettes pendant l'émulsification, celle-ci favorise la stabilité du produit dans le temps, ce qui compense largement les effets néfastes de la viscosité.

IV.5 Comparaison des caractéristiques de produits de charcuterie après substitution des Na-CN par les protéines de PCPB

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'ADIV. L'objectif était de tester la performance des protéines extraites du poumon de bœuf (PCPB) par rapport aux caséinates de sodium (Na-CN) dans la fabrication de produits de charcuterie. Pour cette comparaison, nous avons choisi deux produits réels : la saucisse de Strasbourg (pâte fine) et le saucisson cuit. Le protocole de fabrication a été mentionné en annexe. Les performances du PCPB pour l'émulsification dans ces deux produits ont été comparées aux Na-CN (un agent émulsifiant de référence) selon les quatre critères suivants :

- facilitation de la mise en œuvre des ingrédients protéiques ;
- amélioration du rendement de cuisson ;
- texture des produits finis ;
- aspect et flaveur par dégustation informelle.

IV.5.1 Mise en œuvre des ingrédients protéiques et rendement de cuisson

En ce qui concerne la facilité de mise en œuvre des ingrédients protéiques, nous avons remarqué que la texture de l'émulsion en fin de cutterage était identique avec les Na-CN et le PCPB. Le rendement de cuisson (poids de produit après la cuisson/poids avant la cuisson) pour la pâte fine et le saucisson cuit restent également élevé et comparable à celui obtenu avec les Na-CN (tableau IV.12). Après la cuisson et le refroidissement, la « pelabilité » de la pâte fine et du saucisson cuit à base de PCPB reste aussi comparable, voire supérieure à celle obtenue avec les Na-CN.

Tableau IV.12 : Rendements de cuisson

	Pâte fine	Saucisson cuit
PCPB	96%	98,1%
Na-CN	96,9 %	98,5%

IV.5.2 Texture des produits finis

Un dispositif appelé TPA (Texture Profil Analyser) a été utilisé à l'ADIV pour analyser la texture du produit fini. Il s'agit d'un test de compression constitué de 2 cycles identiques. Plusieurs caractéristiques peuvent être calculées grâce à ce test, mais nous avons retenu la mesure de la « dureté » qui traduit la fermeté du produit. En effet, si une émulsion est mal

liée, cela se traduit par des défauts de texture et notamment de fermeté. La dureté est mesurée par la force au 1^{er} pic de compression. La figure IV.23 donne un exemple de courbe obtenue par un TPA pour le saucisson cuit fabriquée avec le PCPB.

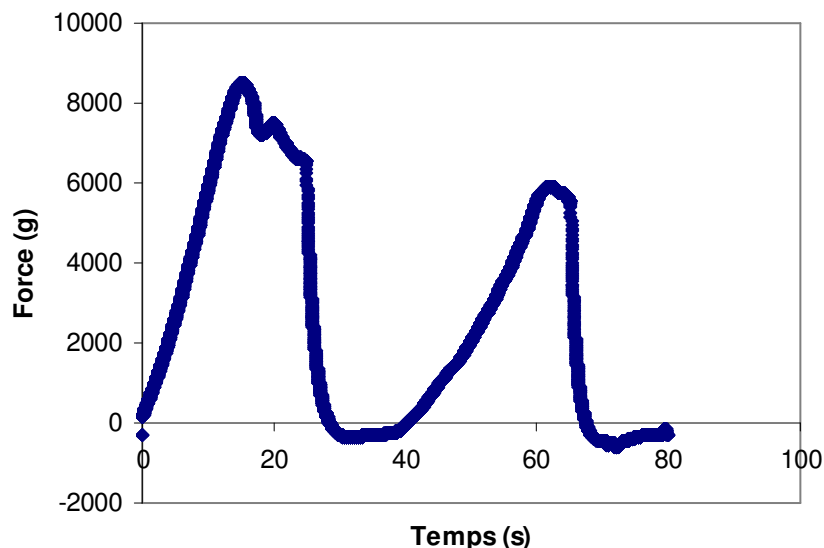


Figure IV.23 : Exemple de courbe de TPA pour le saucisson cuit fabriqué avec le PCPB

Les figures IV.24 et IV.25 présentent les moyennes et les écart-types de cinq essais de mesure de forces au premier pic de compression, respectivement pour les pâtes fines et le saucisson cuit. Sur les mêmes figures, nous avons représenté celles obtenues en utilisant les Na-CN pour comparaison.

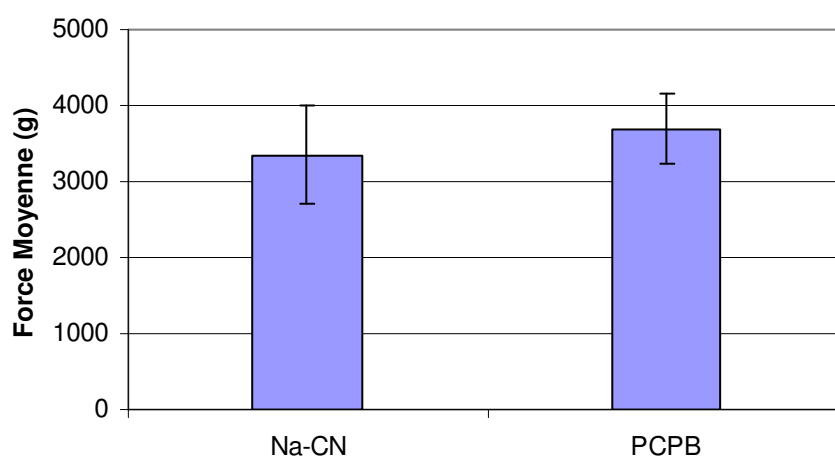


Figure IV.24 : Moyennes et écart-types de la force au premier pic de compression pour les pâtes fines.

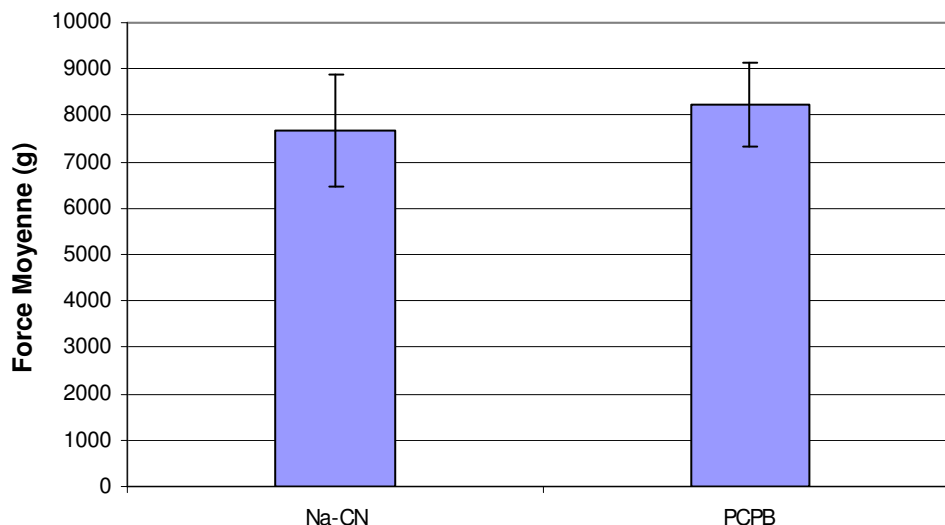


Figure IV.25 : Moyennes et écart-types de la force au premier pic de compression pour le saucisson cuit.

A partir de ces figures, il semble qu'il n'y ait pas de différence significative de fermeté (compte-tenu des écart-types) entre les pâtes fines et les saucissons cuits fabriqués avec les Na-CN et ceux fabriqués avec le PCPB, même si l'on peut observer une fermeté légèrement supérieure avec le PCPB dans les deux produits. De plus, on observe même une réduction de l'écart-type qui pourrait traduire une texture plus homogène avec le PCPB qu'avec les Na-CN.

IV.5.3 Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle a été réalisée lors d'une dégustation informelle par les experts de l'ADIV. Les critères d'évaluation ont porté sur l'aspect (principalement la couleur), la tenue, l'odeur et le goût des produits finis. Les produits ont été dégustés à froid. Les principales conclusions de cette analyse sensorielle sont les suivantes.

Pour les pâtes fines, les experts ont signalé que la couleur des saucisses préparées avec le PCPB était plus rouge que celle des témoins à base de Na-CN. La figure IV.26 montre une image des saucisses de Strasbourg (pâte fine) fabriquées avec le PCPB et avec le témoin (Na-CN). Cela est un avantage pour la fabrication de tels produits, car cela permet de réduire la quantité d'ions nitrites utilisés pour maintenir ou augmenter la couleur rouge des produits carnés. D'autre part, lors du chauffage des produits au micro-onde, il est apparu qu'une mince peau grasse se formait sur les saucisses fabriquées avec Na-CN, mais pas sur celles fabriquées avec le PCPB, ce qui traduit une très bonne tenue de l'émulsion pour les produits fabriqués

avec ces protéines et confirme leur excellente capacité de rétention d'eau et de fixation de la matière grasse lors de la cuisson. Enfin, aucune différence de goût ni d'odeur n'a été détectée pour la pâte fine entre les produits contenant du PCPB et les témoins.

De même, pour les saucissons cuits, il a été noté que la couleur des produits préparés avec le PCPB était plus rouge que celle des témoins. En revanche, aucune différence significative d'aspect, de texture, de goût ou d'odeur n'a été détectée entre les saucissons fabriqués avec les Na-CN et ceux fabriqués avec le PCPB.

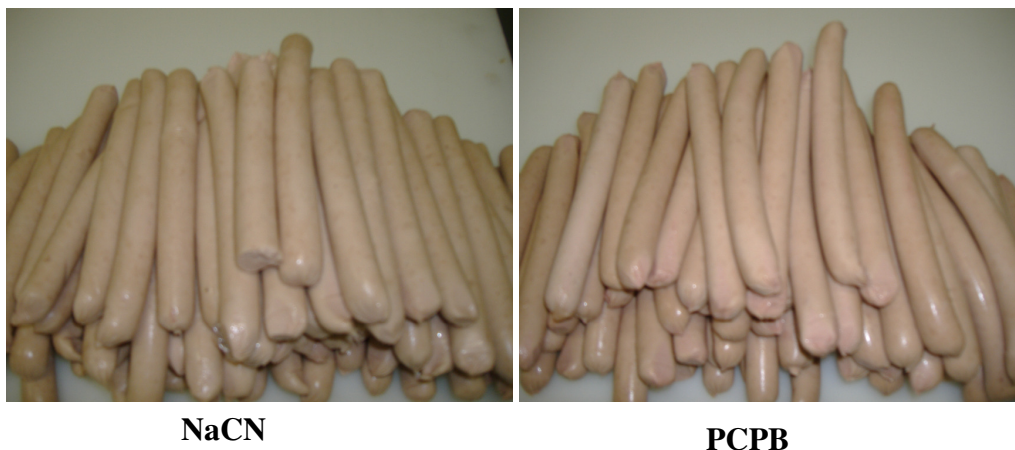


Figure IV.26 : Images des saucisses fabriquées avec le PCPB et avec le témoin (Na-CN).

IV.5.4 Conclusions

En conclusion de cette partie, les essais menés lors de cette étude ont permis de mettre en évidence la faisabilité de l'utilisation des protéines extraites du poumon de bœuf comme agent émulsifiant dans les produits carnés, en substitution aux Na-CN, lors de la fabrication de produits de charcuterie type « pâte fine » et « saucisson cuit ». En effet, les produits fabriqués présentent des rendements de cuisson et une texture équivalents, voire parfois meilleurs, que ceux fabriqués avec les Na-CN, ainsi que des appréciations sensorielles comparables pour les produits dégustés. Notons également que la couleur rouge était plus prononcée sur les produits fabriqués avec le PCPB que sur les témoins, ce qui permettrait de réduire la quantité de nitrites nécessaire lors la fabrication de ces produits.

IV.6 Aptitude des protéines du PCPB au foisonnement

Dans cette partie, l'aptitude du PCPB au foisonnement a été étudiée en l'utilisant comme agent moussant dans des formulations complexes qui contiennent polysaccharides et lipides. Cette étude a été entreprise car les produits foisonnés à base de viande, comme les

mousses de foie de volailles, ont connu un développement croissant ces dernières années. Notre objectif était donc de tester la capacité des protéines de PCPB à former un produit foisonné stable dans le temps.

Dans un premier temps, nous avons réalisé cette opération en batch. Nous avons étudié l'effet de la présence des polysaccharides et des lipides sur le taux de foisonnement. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la capacité de ces protéines à former un produit foisonné en continu. A cet effet, nous avons utilisé le dispositif CF, disponible au laboratoire. Ce choix été dicté par le fait que ce dispositif a déjà été utilisé pour faire foisonner plusieurs formulations réelles et/ou modèles (Thakur, 2005). Réaliser le foisonnement en utilisant ce dispositif nous permettra donc de comparer la capacité des protéines de PCPB à celles des protéines utilisées précédemment dans ces formulations à conditions opératoires identiques.

IV.6.1 Foisonnement en discontinu des formulations complexes

Dans ce mode opératoire, le battage ou le (fouettage) constitue le seul moyen pratique de former une mousse. La force motrice du foisonnement est la puissance fournie par l'agitateur ; à vitesse fixée, la durée de battage reste donc le seul moyen de contrôler le taux de foisonnement. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des polysaccharides sur la capacité moussante du PCPB, puis nous avons analysé l'effet de l'ajout d'huile dans ces mêmes formulations. L'appareil utilisé pour réaliser ces expériences est décrit en détail dans le chapitre matériels et méthodes (voir section II.7.1).

IV.6.1.1 Effet des polysaccharides

Nous avons étudié l'effet de la présence de xanthane (0,25%) et de guar (0,25%), ensemble ou séparément, sur la capacité foisonnante du PCPB, ainsi que celui de l'amidon (entre 3 et 6 % p/p). Ces concentrations sont celles utilisées dans les formulations qui ont fait l'objet des travaux thèses de Labbafi (2005) et de Thakur (2005), mais avec des protéines de lait au lieu du PCPB.

IV.6.1.1.1 Effet du xanthane et du guar

L'influence de la présence du xanthane et/ou du guar a été étudiée dans le but de comparer les performances de chaque polysaccharide en foisonnement avec les PCPB. Les compositions des trois formulations étudiées (F1, F2 et F3) sont présentées dans tableau IV.13. Dans ces trois formulations, la quantité de protéines est constante et égale à 6% p/p. F1 contient les deux polysaccharides (0,25% chacun). En revanche, F2 contient seulement le

xanthane et F3, seulement le guar. Les trois formulations ont été préparées dans les mêmes conditions (II. 6.1).

Tableau IV.13 : Compositions des formulations F1, F2 et F3.

Composition % (p/p)	F1	F2	F3
PCPB	6	6	6
Amidon	0	0	0
Xanthane	0,25	0,25	0
Guar	0,25	0	0,25
Sel	1	1	1
Eau	92,5	92,75	92,75

L'effet de la composition de la matrice sur ses propriétés rhéologiques a été étudié en mode écoulement ; les courbes d'écoulement sont présentées sur la figure IV.27. Il apparaît que les deux formulations F1 et F2 ont un comportement rhéofluidifiant similaire. Les indices d'écoulement et de consistance pour les deux formulation sont respectivement $8,6 \text{ Pa.s}^{0,37}$ et $6,3 \text{ Pa.s}^{0,34}$. En revanche, F3 qui contient seulement le guar comme polysaccharide a montré un comportement rhéologique moins rhéofluidifiant, avec un indice de consistance de $0,74 \text{ Pa.s}^{0,50}$. Il apparaît donc que la présence de guar dans les formulations a un effet moins marqué sur la viscosité apparente de la formulation que celle du xanthane. Il semble donc que le guar présente seulement des interactions faibles avec les protéines ; la co-solubilité semble prédominer, probablement parce que le guar est une macromolécule neutre. En revanche, le xanthane augmente la viscosité de la matrice, mais également son caractère rhéofluidifiant. Cela peut être attribué à la rigidité des chaînes de xanthane qui augmente sa capacité à former un réseau faible à l'aide de liaisons hydrogène, alors que ses charges négatives ont tendance à exclure les protéines. En fait, ce résultat est en accord avec ceux de Narchi et al (2009) qui ont montré que l'addition du guar dans un sirop de glucose ne modifie qu'assez peu le comportement rhéologique de cette matrice Newtonienne, alors que le xanthane double approximativement la valeur de la viscosité de cette même matrice.

Le taux de foisonnement Φ de ces trois formulations a été mesuré à partir de la relation (II.9). Il semble que la capacité moussante de F2 qui contient uniquement le xanthane est la plus élevée, avec $\Phi \approx 800\%$, après une durée de battage de 20 min (figure IV.28), mais la mousse formée s'effondre très vite, ce qui est normal avec un tel taux de foisonnement. Lorsqu'on remplace le xanthane par le guar (F3), le taux de foisonnement diminue à 500% avec effondrement rapide de la mousse obtenue comme dans le cas de F2. Il semble donc que

l'augmentation de la viscosité de la matrice initiale n'a pas eu effet sur la stabilité de la mousse obtenue en fonction de temps. La capacité moussante de la formulation F1 qui contient simultanément les deux polysaccharides ($\Phi \approx 135\%$) est réduite par rapport à celle de F2 et F3. Cependant, cette formulation (F1) présente la meilleure stabilité en fonction du temps.

Pour les trois formulations, une distribution monomodale de tailles des bulles a été observée avec des d_{32} respectivement de 0,18, 0,21 et 0,19 mm pour F1, F2 et F3 (figure IV.29). Des micrographes illustrant les distributions des tailles de bulles sont également présentées sur la figure IV.30. Il apparaît que la composition initiale de ces formulations n'a d'effet significatif sur d_{32} , malgré son effet marqué sur le taux de foisonnement. Globalement, ni la viscosité, ni la formulation ne permettent d'expliquer simplement les résultats du foisonnement en mode discontinu en fonction de la viscosité de la matrice, situation fréquemment rencontrée lors du foisonnement en batch lorsque la durée de battage n'est pas optimisée par formulation.

En conclusion, il semble que bien que la formulation F1 ait fait apparaître le taux de foisonnement le plus faible, la stabilité des mousses obtenues était meilleure pour cette formulation que celles produites avec F2 et F3. En conséquence, cette formulation a été choisie dans la suite de ce travail pour étudier l'effet de la présence de l'amidon sur le foisonnement.

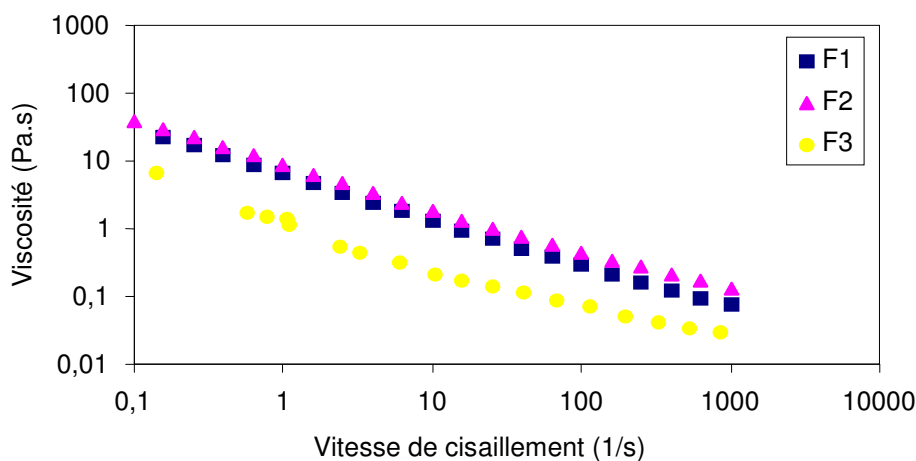


Figure IV.27 : Évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour les formulations F1, F2 et F3.

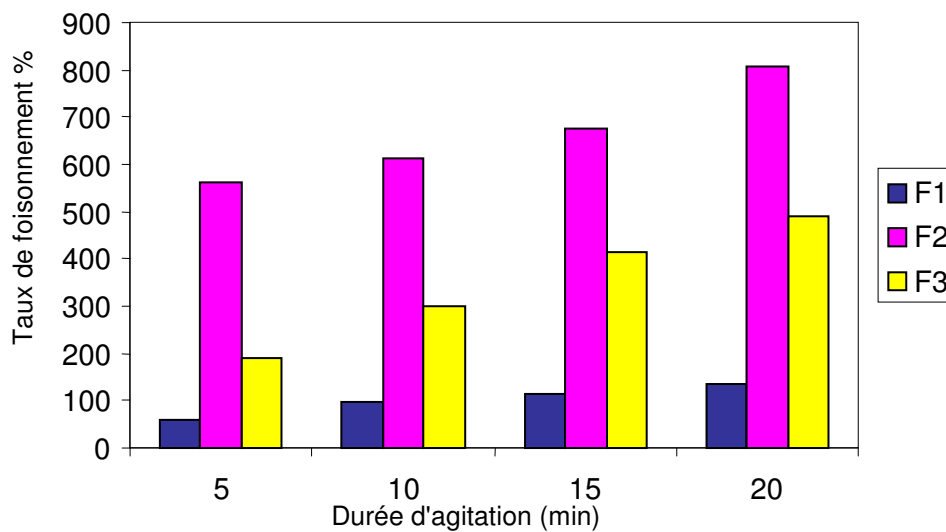


Figure IV.28 : Taux de foisonnement en fonction de temps pour F1, F2 et F3

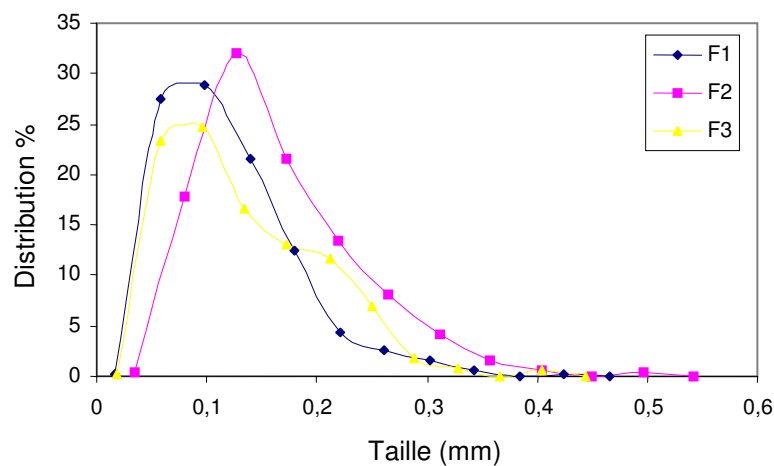


Figure IV.29 : Évolution des distributions des tailles de bulles pour les formulations F1, F2 et F3 (20 min de battage).

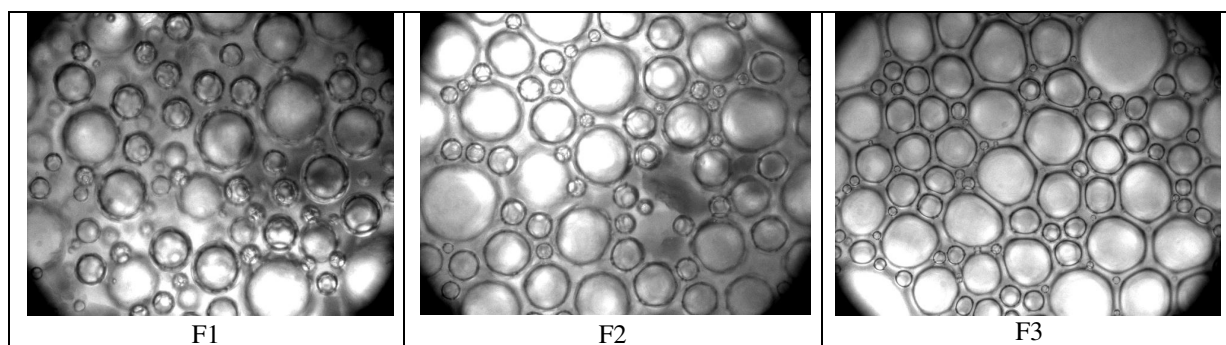


Figure IV.30 : Micrographes des bulles dans les produits foisonnés issus des trois formulations F1, F2 et F3.

IV.6.1.1.2 Effet de la présence d'amidon

Dans le but d'étudier l'effet de l'addition d'amidon sur les propriétés moussantes du PCPB, trois formulations modèles (F1, F4 et F5) ont été préparées. Les compositions de ces formulations (% p/p) sont présentées dans le tableau IV.14. On rappellera que les trois contiennent les mêmes quantités de PCPB, xanthane et guar. Seule la teneur en amidon, agent épaississant, varie d'une formulation à l'autre (de 3 à 6%). En effet, comme nous avons montré précédemment que le PCPB augmente la viscosité des solutions dans laquelle il est ajouté, notre objectif est donc de vérifier s'il permet d'obtenir un produit foisonné stable dans le temps lors d'un ajout d'une quantité importante d'amidon.

Tableau IV.14 : Composition des formulations F1, F4 et F5.

Composition % (p/p)	F1	F4	F5
PCPB	6	6	6
Amidon	0	3	6
Xanthane	0,25	0,25	0,25
Guar	0,25	0,25	0,25
Sel	1	1	1
Eau	92,5	89,5	86,5

L'étude des propriétés rhéologiques de ces formulations en mode écoulement est présentée sur figure IV.31 en fonction de la vitesse de cisaillement. Les résultats montrent que les trois formulations ont un comportement rhéofluidifiant avec un indice d'écoulement $n \approx 0,3$, ce qui est attendu en raison de la présence d'un polysaccharide comme le xanthane. En revanche, la présence d'amidon modifie la consistance de la matrice (k). On notera que la viscosité apparente de la formulation F5 est plus élevée que pour les deux autres formulations, quel que soit le gradient de vitesse, avec un indice de consistance de $36,7 \text{ P.s}^{0,37}$. Cela est dû à la présence d'une quantité élevée d'amidon (6% p/p) dans cette formulation. En première approximation, on pourra considérer que l'amidon augmente la consistance de la matrice, sans modifier son indice d'écoulement.

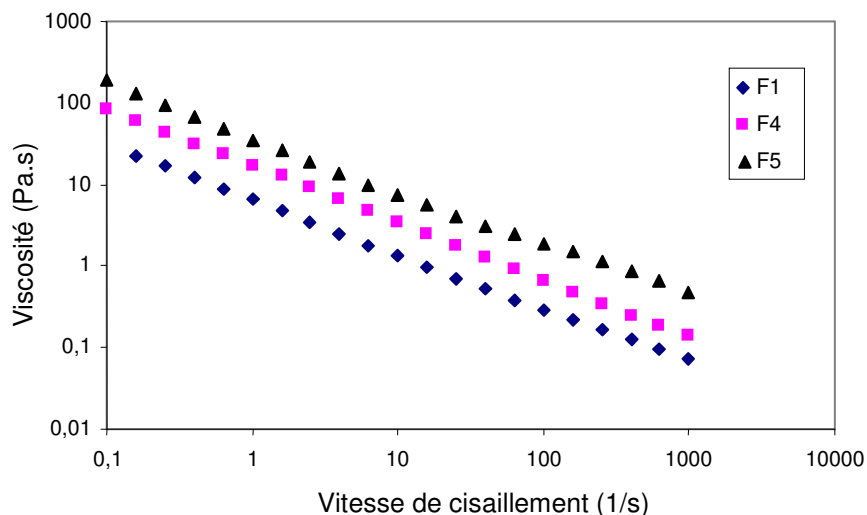


Figure IV.31 : Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement pour les formulations F1, F4 et F5.

Nous avons ensuite étudié le foisonnement de ces formulations en discontinu en fonction du temps de battage (5, 10, 15 et 20 min). La figure IV.32 présente l'évolution de Φ en fonction du temps de battage. Elle montre que F4 présente le taux de foisonnement le plus élevé (300% à 20 min). L'absence d'amidon dans F1 a un effet négatif sur Φ . L'augmentation de la concentration d'amidon à 6% dans F5 diminue également Φ par rapport à F4. Concernant la stabilité des mousses obtenues, les trois s'effondrent assez rapidement au cours du temps, sans différence apparente. La figure IV.32 montre également que le taux de foisonnement augmente (dans la limite de la capacité du récipient) avec la durée de battage, quelle que soit la formulation. Φ augmente avec la durée de battage jusqu'au moment où il atteint un plateau. Par exemple, le taux de foisonnement n'augmente que très faiblement pour F5 entre 15 et 20 min de battage. Ces résultats sont en accord avec ceux de Radu (2007) lors du foisonnement d'une formulation modèle à base de sirop de glucose.

Par ailleurs, comme le montre la figure IV.33 pour les trois formulations, la distribution des tailles de bulles semble être monomodale. Le diamètre moyen d_{32} des bulles est respectivement de 0,18, 0,15 et 0,13 mm pour F1, F4 et F5. Donc la viscosité de la matrice a un effet très faible sur d_{32} ; l'augmentation de la viscosité a diminué légèrement d_{32} . En fait, la viscosité élevée a un effet ambivalent sur les bulles ; dans un premier temps, elle rend difficile leur coalescence, ce qui pourrait expliquer pourquoi d_{32} diminue, mais en même temps, elle stabilise des bulles plus grosses.

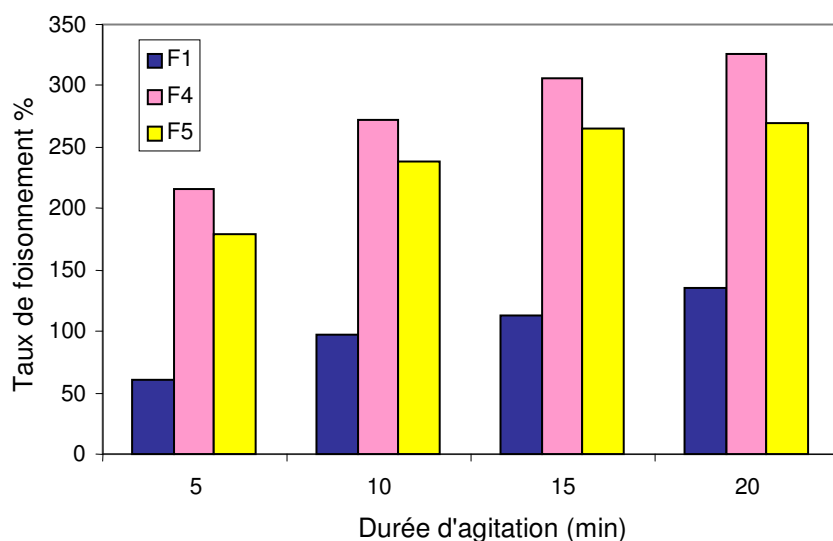


Figure IV.32 : Taux de foisonnement en fonction du temps de battage pour F1, F4 et F5.

Le temps de battage influence également le diamètre moyen des bulles dans les mousses formées. Par exemple, d_{32} vaut 0,25 mm après 5 min de battage pour F4 et il tombe à 0,18 mm après 20 min de battage. Il semble que l'augmentation de la durée de battage, donc du traitement mécanique, favorise une légère réduction de la taille des bulles. Cet effet a été également constaté par McClement (1999). Comme la formulation F4 a présenté le meilleur taux de foisonnement, nous l'avons donc retenue pour étudier l'effet d'ajout de l'huile sur la capacité moussante du PCPB.

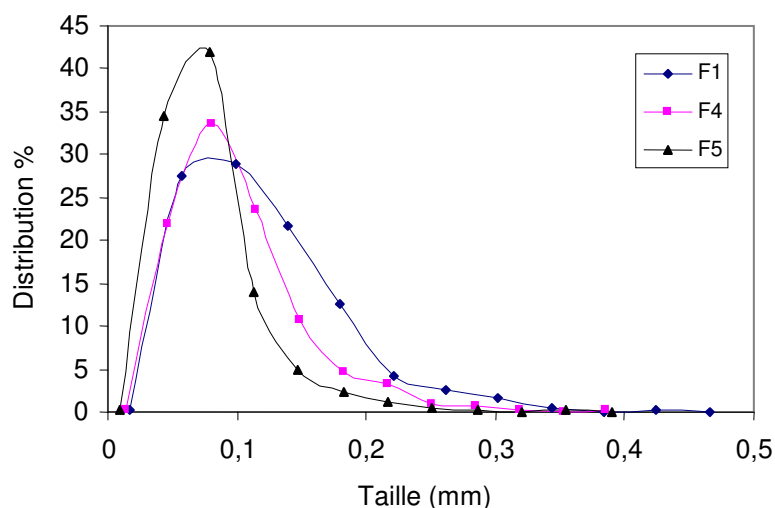


Figure IV.33 : Distribution des tailles de bulles pour F1, F4 et F5 (20 min de battage)

IV.6.1.2 Effet de l'addition d'huile

L'effet de la présence d'huile sur le foisonnement de la formulation F4 a été étudié en faisant varier la quantité d'huile entre 5 et 15 % (p/p). Ces nouvelles formulations sont nommées respectivement F4a et F4b. Leurs compositions sont présentées dans le tableau IV.15. Comme le montre la figure IV.34, l'ajout d'huile semble réduire la viscosité apparente de la formulation F4 à faible vitesse d'agitation. Par contre, à forte vitesse d'agitation (1000 1/s), la formulation F4b qui contient 15% d'huile a une viscosité plus élevée que celle en l'absence d'huile F4. La viscosité apparente de ces formulations est respectivement de 17,1 Pa.s^{0,3}, 4,7 Pa.s^{0,46} et 7,7 Pa.s^{0,45} pour F4, F4a et F4b. il semble donc que l'ajout d'huile a diminué surtout l'indice de consistance de cette formulation, mais qu'il a augmenté l'indice d'écoulement.

Ces formulations ont fait l'objet d'un foisonnement en batch à une vitesse d'agitation constante, mais avec plusieurs durées de battage (5, 10, 15 et 20 min). Les résultats sont présentés sur la figure IV.35. Force est de constater que l'addition d'huile provoque une diminution importante du taux de foisonnement, quelle que soit la durée de battage. Plus la concentration en huile augmente, plus la diminution du taux de foisonnement est importante. Il faut noter que l'huile, comme la matière grasse en général, est considérée comme un agent dépresseur de mousse, d'autant plus que l'huile contient très peu de matière grasse cristallisée (Dickinson, 1995). Dans le cas des protéines de PCPB, il semble aussi que l'affinité que ces protéines ont pour la phase grasse (fortes hydrophobicité de surface et activité émulsifiante IV.3) les empêche d'être disponibles à l'interface gaz/liquide.

Tableau IV.15 : Composition des formulations F4, F4a et F4b.

Composition % (p/p)	F4	F4a	F4b
PCPB	6	6	6
Amidon	3	3	3
Xanthane	0,25	0,25	0,25
Guar	0,25	0,25	0,25
Huile	0	5	15
Sel	1	1	1
Eau	89,5	84,5	74,5

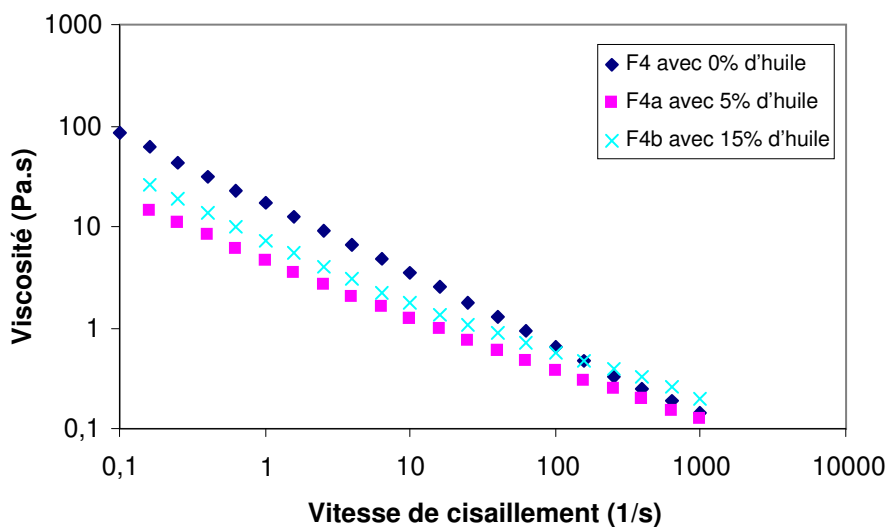


Figure IV.34 : Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement pour les formulations F4, F4a et F4b

Nous avons également étudié l'effet de la présence de l'huile sur la distribution des tailles des bulles (figure IV.36). D'après cette figure, il apparaît que F4a et F4b ont des tailles de bulles bien plus petites que F4, vraisemblablement parce que ces deux formulations ne sont pas capables de stabiliser des bulles plus grosses que celles observées sur la figure IV.36, ce qui expliquerait en retour leurs taux de foisonnement plus faibles.

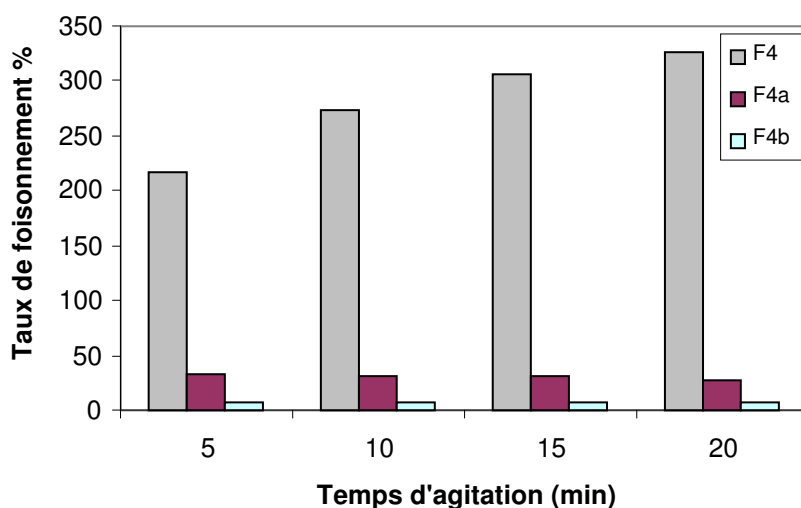


Figure IV.35 : Effet de l'ajout d'huile sur le taux de foisonnement

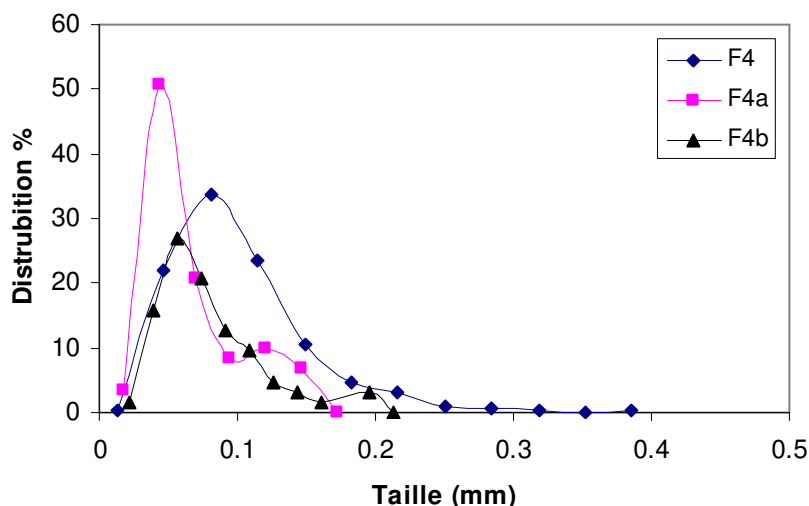


Figure IV.36 : Distributions des tailles de bulles pour F4, F4a et F4b

En conclusion, on retiendra que même si les protéines du PCPB ont un pouvoir moussant important même en présence des polysaccharides, l'ajout d'une phase grasse diminue considérablement la capacité moussante de ces protéines. Ce résultat peut être dû en partie à une diminution de la viscosité de la phase continue en présence d'huile qui est défavorable à la stabilisation des bulles dans la matrice. Il peut également être expliqué par la forte affinité des protéines de PCPB pour l'huile, qui les empêcherait d'être disponibles aux interfaces gaz-liquide et donc de pouvoir stabiliser les bulles de gaz dans la matrice. Cela s'ajoute au fait que les mousses obtenues à partir de F4 (i.e. sans huile) s'effondraient déjà rapidement lors du stockage. Enfin, on notera également qu'un dispositif tel que celui que nous avons utilisé ne permet pas un bon contrôle du foisonnement. En effet, contrairement à un procédé continu dans lequel les étapes limitantes sont la dispersion et la stabilisation du gaz, il faut y ajouter l'incorporation du gaz par le ciel dans le cas d'un procédé discontinu ; l'effet des conditions opératoires est donc encore plus difficile à analyser dans le cas d'un procédé discontinu. Pour cette raison, nous avons décidé de réaliser des expériences en continu afin d'explorer l'effet des conditions opératoires sur l'efficacité de foisonnement.

IV.6.2 Étude du foisonnement en continu

Pour ces expériences, nous avons utilisé la colonne de foisonnement CF. Dans un premier temps, une formulation appelée « Fa » a été utilisée : sa composition est la même que celle utilisée par Thakur (2003), excepté le fait que les protéines de lait ont été remplacées par le PCPB (tableau IV.16).

Tableau IV.16 : Composition de la formulation Fa

Composition %	Fa
PCPB	6
Amidon	6
Xanthane	0,25
Guar	0,25
Huile	14,1
Sel	1
Eau	40,9
Glace	31,5
MS	27,6
Protéines/MS	14,5
Lipides/MS	54,3

La figure IV.37 montre l'évolution de la viscosité apparente, étudiée à 4°C en fonction de la vitesse de cisaillement, pour cette formulation. Comme pour la formulation utilisée par Thakur (2005), Fa a un comportement rhéofluidifiant avec un indice de consistance plus élevé et un caractère plus rhéofluidifiant ($88 \text{ Pa.s}^{0,22}$ pour Fa) que celui obtenu avec les protéines de lait ($75,6 \text{ P.s}^{0,36}$), ce qui confirme que le PCPB apporte une viscosité supplémentaire à la matrice. Ce résultat est en accord avec ce qui a été montré dans la section IV.5.3, lors de la comparaison de la viscosité des matières premières contenant respectivement les Na-CN et le PCPB.

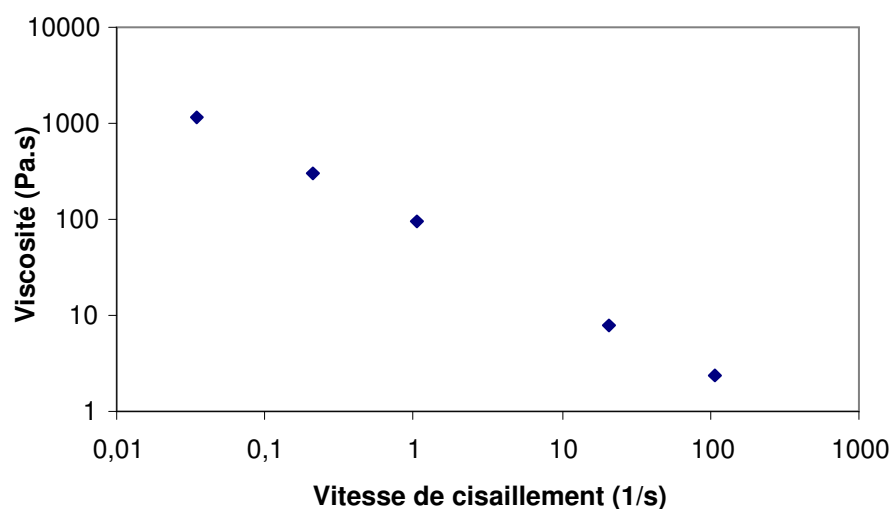


Figure IV.37 : Viscosité apparente de la formulation Fa en fonction de la vitesse de cisaillement

Le foisonnement a également été effectué à 4°C ; il a été conduit avec un rapport de débits gaz/liquide (G/L) égal à 1, en faisant varier la vitesse d'agitation (tableau IV.17). Signalons

que ce rapport de débit correspond à un taux de foisonnement théorique de 100%. Les résultats montrent que quelles que soient les conditions opératoires, un phénomène de pistonnage (blow-by) a toujours été observé. La présence de ce phénomène nous a empêchés de comparer nos résultats avec ceux de Thakur (2005). Dans le tableau IV.17, le taux de foisonnement ne dépasse pas 28% à 1200 tpm. Le diamètre moyen d_{32} des bulles à cette vitesse est de 120 μm . Cependant, comme le montre la figure IV.38, cette distribution reste assez étroite. On notera enfin que le taux de foisonnement observé à 1200 tpm correspond à peu près à celui recherché dans de nombreuses préparations de type « mousses salées » à base de viande. En effet, selon Campbell et al (1999), la quantité d'air incorporée dans les mousses salées de charcuterie est en général comprise dans l'intervalle 30-40%.

Tableau IV.17 : Évolutions de Φ et de d_{32} en fonction des conditions opératoires pour la formulation Fa.

G (mL/min)	L (mL/min)	N (tpm)	Φ (%)	d_{32} (mm)
10	10	800	10	-
10	10	1000	8	-
10	10	1200	28	0,12
20	20	800	20	-
20	20	1000	17	-

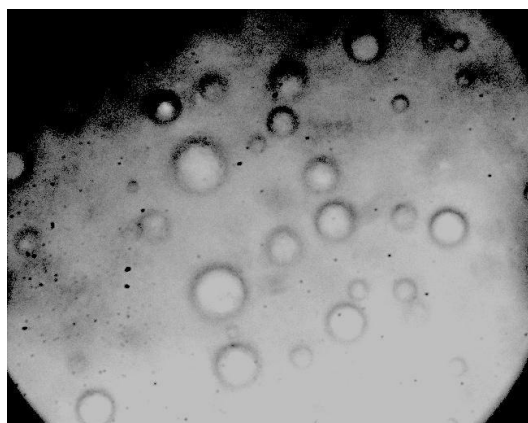


Figure IV.38 : Micrographes des bulles ($d_{32}=120 \mu\text{m}$) pour la formulation Fa (G/L=10/10, N=1200 tpm)

Par la suite nous avons testé l'aptitude au foisonnement de la même formulation en augmentation progressivement sa teneur en PCPB de 6 à 12% p/p. En fait, le pourcentage de protéines dans une mousse de foie est généralement de 9%, ce qui est équivalent à environ à 12% de PCPB (75% de protéines dans la poudre de PCPB). Cette formulation a été nommée Fb. Le foisonnement en continu dans la colonne de foisonnement a été effectué à 20°C au lieu

de 4°C pour diminuer la viscosité de la formulation. Nous avons encore constaté la présence d'un phénomène de pistonnage, sans avoir réussi à améliorer le taux de foisonnement. Il semble donc que ce soit bien l'effet négatif de la présence de l'huile qui impacte la capacité moussante du PCPB, comme lors du foisonnement en discontinu.

Tableau IV.18 : Composition de la formulation Fc

Composition %	Fc
PCPB	12
Amidon	3
Xanthane	0,25
Guar	0,25
Huile	0
Sel	1
Eau	43,5
Glace	40
MS	16,5
Protéines/MS	54,5
Lipides/MS	12,1

Pour confirmer ce résultat, nous avons testé une formulation Fc avec la même composition que Fb, mais sans lipides (tableau IV.18). L'étude rhéologique de cette formulation à 20°C a montré un comportement rhéofluidifiant avec un indice de consistance de 31 Pa.s^{0,30}. Le foisonnement en continu a été effectué avec des rapports de débits gaz/liquide (G/L) de 10/20 et 20/20 (mL/min), ce qui correspond respectivement à un taux de foisonnement théorique de 50 et de 100%. La vitesse d'agitation N a été variée entre 800 et 1200 tpm. Les conditions opératoires et le taux de foisonnement sont résumés dans le tableau IV.18. D'après ce tableau, on constate que le taux de foisonnement augmente avec la vitesse d'agitation et atteint la valeur théorique de 50% ou de 100% en augmentant la vitesse d'agitation. Cependant, si pour un rapport de débit 10/20, le diamètre moyen diminue quand la vitesse augmente, ce n'est pas toujours le cas pour le rapport 20/20. Il semble donc que l'augmentation de ce rapport, si elle conduit à un taux de foisonnement plus élevé, augmente aussi la probabilité de coalescence entre les bulles formées. Par ailleurs, on notera que la distribution des tailles des bulles est monomodale et assez étroite pour les trois vitesses d'agitation étudiées (figure IV.39).

Tableau IV.19 : Évolutions de Φ et d_{32} en fonction des conditions opératoires pour la formulation Fc.

G (mL/min)	L (mL/min)	N (tpm)	Φ %	d_{32} (μm)
10	20	800	40	140
10	20	1000	53	120
20	20	800	60	100
20	20	1000	77	170
20	20	1200	99	130

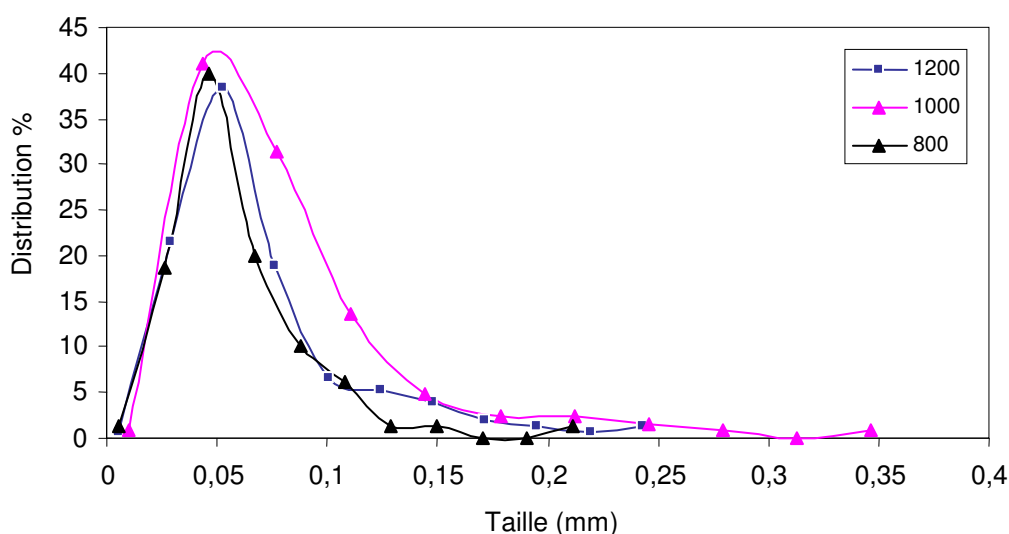


Figure IV.39 : Distribution des tailles des bulles en fonction de la vitesse d'agitation pour la formulation Fc.

IV.6.3 Conclusions

En conclusion de cette partie, on retiendra que le foisonnement en batch avec les protéines de PCPB comme agent moussant n'est pas affecté par la présence des polysaccharides, mais qu'il est fortement affecté par la présence des lipides. Cependant, malgré la viscosité élevée de ces formulations, les mousses formées en présence de polysaccharides et d'amidon s'effondrent rapidement en fonction du temps. Il a également été démontré que le foisonnement en continu de ces protéines avec une formulation dont la composition est la même que celle utilisée par Thakur (2005) est toujours accompagné par un phénomène de pistonnage avec le PCPB. En revanche, ce phénomène disparaît lors du foisonnement de la même formulation en l'absence d'huile. Ce résultat peut être attribué à l'effet « dépresseur de mousse » qui est bien connu pour les lipides sur les mousses protéiques. De plus, les PCPB ont montré une très forte affinité pour la phase grasse (section

IV.3), ce qui rend vraisemblablement ces protéines moins disponibles pour stabiliser les interfaces gaz-liquide en présence d'une phase grasse. En conséquence, on retiendra que le PCPB conserve une forte aptitude au foisonnement en l'absence d'huile et qu'il peut être utilisé en présence d'huile lorsque l'objectif est d'alléger de 20-30% le produit dans ce cas.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Dans le domaine des coproduits d'abattage, rares ont été les travaux entrepris jusqu'à présent pour caractériser et valoriser les protéines contenues dans ces coproduits si l'on excepte le cas du sang. L'objectif de notre travail était donc de combler en partie le manque d'informations disponibles. Dans ce but, nous avons retenu deux coproduits : la VSM (Viande Séparée Mécaniquement) de têtes de poulets et le poumon de bœuf ; ces coproduits ont été choisis en concertation avec notre partenaire, l'ADIV, selon les recommandations de la filière des abattoirs en France.

Dans un premier temps, l'objectif était de s'intéresser aux conditions d'extraction, de purification et de concentration de ces protéines par la mise au point de méthodes simples et économiques. Ensuite, il s'agissait de quantifier leurs propriétés fonctionnelles et de les comparer à celles d'ingrédients protéiques commerciaux (caséinates de sodium, protéines de lactosérum, isolats de soja, de blanc d'œuf et de plasma). Dans un souci d'optimisation, notre démarche expérimentale a consisté à rechercher les conditions optimales afin d'extraire et de concentrer les protéines des deux coproduits. Ainsi, nous avons montré que les conditions optimales pour solubiliser les protéines des deux coproduits sont un rapport massique coproduit/eau de 20%, un pH de 9 et une durée d'extraction de 60 min. Toutefois, la température optimale pour extraire les protéines de la VSM était de 40°C, alors qu'elle était de 20°C pour le poumon de bœuf. Une fois les protéines solubilisées, nous avons tenté de les purifier par des techniques membranaires (microfiltration MF). A cet effet, nous avons utilisé des membranes de microfiltration avec un seuil de coupure de 1,4 µm. Toutefois, la présence d'une quantité élevée de matières grasses dans ces coproduits a constitué un obstacle majeur à l'utilisation de cette technique. Ainsi, nous avons constaté une diminution rapide de la perméabilité des membranes en raison d'un effet de colmatage dû à la rétention de la matière grasse par la membrane. Le rendement total de récupération des protéines par cette technique n'était donc que de 15% (p/p) pour la VSM et de 38% (p/p) pour le poumon de bœuf. Nous avons alors cherché à remplacer cette technique par une méthodologie fondée sur la précipitation des protéines au point isoélectrique. Cette méthode a été fréquemment employée dans la littérature pour l'extraction des protéines végétales et même parfois pour les coproduits animaux (Ledward et Gault, 1985). L'étude de l'influence de pH a montré que les protéines des deux coproduits étudiés ont un pI entre 4 et 4,5. Le rendement total de la

récupération des protéines par cette méthode était de 55% (p/p) pour la VSM et de 40% (p/p) pour le poumon de bœuf. Toutefois, il faut mentionner que les concentrées protéiques obtenus par précipitation, surtout ceux de VSM, contenaient une fraction importante de matières grasses ; en conséquence, nous avons alors tenté de purifier les protéines par extraction des lipides au moyen de solvants organiques (hexane et isopropanol), au prix d'une chute du rendement de récupération des protéines.

Le deuxième objectif de notre travail était de mesurer les propriétés fonctionnelles (gélifiantes, moussantes et émulsifiantes) des concentrées protéiques de ces coproduits et de les comparer à celles des ingrédients commerciaux. Concernant les protéines issues de la VSM, nos résultats ont montré que ces protéines ont une force de gel importante (45000 Pa), beaucoup plus élevée que les protéines de plasma (17000 Pa), ce dernier ingrédient étant considéré comme un des meilleurs agents gélifiants dans le secteur des produits carnés. Si le pouvoir moussant et la stabilité des mousses de ces protéines étaient plus faibles que ceux du blanc d'œuf, ils sont restés néanmoins comparables à ceux des protéines de lactosérum. De plus, les protéines de VSM issues de la concentration par MF ont montré une bonne activité émulsifiante, meilleure que celle des protéines issues de la précipitation, que ce soit avant ou après l'extraction de la matière grasse. Ce résultat mérite d'être souligné car il démontre que la méthode de séparation n'a pas uniquement un effet sur le rendement de l'opération, mais qu'elle modifie également la composition et les propriétés des protéines des concentrées. Retenons par ailleurs que, pour cette même raison, l'élimination de la matière grasse après précipitation au pI a eu un impact négatif sur les propriétés gélifiantes et moussantes des protéines de VSM, mais que cela a au contraire amélioré ses propriétés émulsifiantes.

Pour les protéines de poumon de bœuf, nous avons focalisé notre étude sur les concentrées obtenus par précipitation au pI, dénotés PCPB ; nous avons étudié les propriétés physicochimiques de leurs protéines : par exemple, nous avons caractérisé les solutions de PCPB en termes de répartition des poids moléculaires, d'hydrophobicité de surface et de tensions de surface et interfaciale. Cette étude nous a permis de mieux comprendre leurs comportements rhéologiques et interfaciaux, ainsi que leur rôle dans des opérations telles que l'émulsification et le foisonnement. Nos résultats ont montré que le PCPB présente un large spectre de masses moléculaires, avec des agrégats insolubles et solubles d'une part, et des composés de faibles masses moléculaires d'autre part. Ces protéines ont une hydrophobicité de surface plus élevée que celles des autres protéines commerciales, excepté les isolats de soja qui sont connus pour être de très bons émulsifiants. La forte hydrophobicité de surface, les faibles tensions de surface et tension interfaciale, ainsi que le taux élevé de lipides dans le

PCPB pourraient en partie provenir de la présence de « surfactant pulmonaire » qui est en fait composé de lipoprotéines riches en phospholipides fortement hydrophobes (Galdston et al., 1969). Toutefois, les comportements aux interfaces peuvent être expliqués par la présence en abondance de protéines de faibles masses moléculaires dans le PCPB, ces protéines pouvant diffuser rapidement pour stabiliser les interfaces.

L'étude des fonctionnalités des protéines de poumon de bœuf et leur comparaison avec les autres ingrédients commerciaux ont démontré qu'elles ont de bonnes propriétés gélifiantes et le meilleur pouvoir de rétention d'eau (11,6 mL/g de protéines). La capacité émulsifiante de ces protéines (320 mL/g) reste légèrement plus faible que celle des Na-CN (400 mL/g) ou de l'isolat de soja (362 mL/g), mais meilleure que celles des protéines de lactosérum et de blanc d'œuf. De plus, il faut noter que le PCPB présente la plus forte activité émulsifiante parmi les ingrédients étudiés dans ce travail. Ce résultat est d'autant plus remarquable que cette capacité a été comparée à celles d'isolats de protéines de grande pureté, alors que le PCPB contient environ 15% (p/p) de lipides. Ce dernier point n'est cependant pas contradictoire avec le fort pouvoir émulsifiant car il confirme la très grande affinité des protéines du PCPB pour les lipides en général. En pratique, ces lipides du PCPB sont vraisemblablement associés à des protéines hydrophobes pour former des lipoprotéines et restent en partie disponibles pour favoriser la formation et à la stabilisation d'une émulsion : ainsi, la stabilité émulsifiante pour le PCPB reste similaire à celle des Na-CN. Enfin, on retiendra que la capacité moussante du PCPB est inférieure à celle des protéines de lactosérum, mais beaucoup plus élevée que celle de l'isolat de soja ; de même, elle reste plus forte que celle de la plupart des autres ingrédients commerciaux, excepté le blanc d'œuf.

Afin de se rapprocher des applications sur produits réels, la capacité du PCPB à former une émulsion en présence d'un agent épaississant (le xanthane) a été étudiée lors d'une opération d'émulsification en continu. Il s'agissait d'estimer l'influence combinée des paramètres de formulation et des conditions opératoires du procédé sur la fonctionnalité de ces protéines. Compte tenu du nombre important et de la nature diverse des paramètres, un plan d'expériences de type « split-plot » a été utilisé. Les résultats ont démontré la bonne capacité du PCPB à former une émulsion en continu. Si la taille des gouttelettes dans les émulsions dépend uniquement des conditions opératoires, en particulier de la vitesse d'agitation, la texture de l'émulsion résulte principalement des choix de formulation, alors que la stabilité des émulsions est conditionnée à la fois par la formulation et le procédé, ce qui illustre dans un cas encore simple la complexité des opérations de transformation dans le domaine alimentaire. Globalement, le PCPB a démontré des performances similaires, voire

supérieures aux Na-CN, ce qui en fait potentiellement un très bon agent émulsifiant. Ceci est confirmé par la dernière partie de notre travail, dans laquelle l'aptitude du PCPB a été étudiée sur des produits réels (pâte fine, saucisson cuit) en collaboration avec l'ADIV. En revanche, nos résultats ont démontré que le PCPB n'est pas un bon agent foisonnant dans une formulation contenant de la matière grasse, aussi bien en batch qu'en continu. Ce comportement semble lié à la forte affinité de ces protéines pour la phase grasse qui les empêche d'être disponibles aux interfaces gaz liquide.

En conclusion, nos travaux ont mis en lumière la possibilité d'extraire et de purifier les protéines de deux coproduits animaux avec des rendements globaux de récupération supérieurs à 50% et d'obtenir des concentrés présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes, notamment gélifiantes et émulsifiantes. Les conditions utilisées ont donc permis de maintenir les fonctionnalités de ces protéines, mais celles-ci restent cependant fortement dépendantes de la méthode de séparation. Nos résultats, combinés à ceux de Masselot (2005), ont également montré que les techniques membranaires doivent être réservées aux coproduits présentant de très faibles taux de matières grasses. Dans le cas contraire, la précipitation au pI semble la méthode la plus simple et la plus économique. Celle-ci ne permet cependant pas d'obtenir des isolats protéiques car seule une faible fraction de la matière grasse est éliminée par précipitation. Un compromis doit alors être trouvé entre d'une part la pureté des protéines, et d'autre part le rendement de récupération et les fonctionnalités : en effet, l'élimination des matières grasses s'est souvent accompagnée non seulement d'une diminution attendue du rendement de l'opération, mais aussi d'une perte de fonctionnalités. En fin de compte, nos résultats démontrent clairement que la valorisation des coproduits d'abattage sous forme d'ingrédients protéiques est possible, mais que de nombreux travaux sont encore nécessaires afin d'optimiser les rendements et propriétés et que chaque coproduit constitue un cas particulier avec ses propres spécificités. En conséquence, nous proposons pour la suite de ce travail les perspectives suivantes :

- améliorer le rendement d'extraction des protéines, par exemple par la présence de sel lors de l'étape de la solubilisation des protéines ;
- réduire la quantité de lipides lors de l'étape de solubilisation en utilisant des agents tensioactifs tels que les Tween® ou les Span®, seuls ou couplés avec des enzymes, par exemple une solution de lipases ;
- étudier l'aspect thermique comme le séchage par atomisation qui est beaucoup plus économique que la lyophilisation, mais aussi ses conséquences sur les propriétés fonctionnelles des protéines ;

- enfin, si les résultats obtenus permettent d'envisager le passage à l'échelle industrielle, une analyse technico-économique du procédé reste indispensable, notamment par rapport à l'étape de purification/concentration, afin d'optimiser les conditions de changement d'échelle, à la fois en termes de rendement et de fonctionnalités.

Références

Références

- Acton, J.C. & Saffle, R.L. (1970). Stability of oil-in-water emulsions. I: Effect of surfaces tension, level of oil, viscosity and type of meat proteins. *Journal of Food Science*. 35, 854-855.
- Ammar, E. & Hmani, H.P. (2000). Valorisation et conservation des viandes séparées mécaniquement : les saucisses de Francfort. *Association africaine de microbiologie et d'hygiène alimentaire*. 12, 15-20.
- Antonov, Y.A. Grinberg, V.Y. Zhuravskaya, N.A. & Tolstoguzov, V.B. (1980). Liquid two-phase water-protein-polysaccharide systems and their processing into textured protein products. *Journal of Texture Studies*. 11, 199-215.
- Akintayo, E.T. (1999). Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*. 66, 51-56.
- Arêas, J.A.G. & Alcocer, J.C. (1993). Effect of organic solvent and the lipid content on functionality of bovine lung protein isolates. *Food Chemistry*. 48, 285-290.
- Arêas, J.A.G. & Lawrie, R.A. (1984). Effect of lipid-protein interactions on extrusion of offal protein isolates. *Meat Science*. 11, 275-299.
- Arêas, J.A.G. & Lawrie, R.A. (1990). Scanning calorimetric on offal protein isolates, *Meat Science*. 17, 25-35.
- Arjomaa, P. & Hallman, M. (1988). Purification of a hydrophobic surfactant peptide using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 171, 207-212.
- Arntfield, S. D. (1996). Effects of divalent cations, phytic acid, and phenolic compounds on the gelation of ovalbumin and canola proteins in Parris N Kato N, Cramer L K and Pearce J, *Macromolecular Interactions in Food Technology*, Washington, American Chemical Society Symposium series. 650, 82-92.
- Barbut, S. & Mittal, G.S. (1992). Use of carrageenans and xanthan gums in reduced fat breakfast sausages. *Journal of Food Science and Technology (LWT)*. 25, 509-513.
- Bastos, D.H.M. & Arêas, J.A.G. (1990). Lung proteins: effect of defatting with several solvents and extrusion cooking on some functional properties. *Meat Science*. 28, 223-235.
- Batista, I. (1999). Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. *European Food Recherche and Technolgy*. 210, 84-89.
- Beuchat, L.R. (1977). Functionnal and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25, 258-261.
- Blonk, J.C.G. & Vanaalst, H. (1993). Confocal scanning light microscopy in food research. *Food Research International*. 26, 297-311.

- Boland, M.J. (2002). Aqueous two-phase extraction and purification of animal proteins. *Molecular Biotechnology*. 20, 85-93.
- Boles, J. A. Rathgeber, B.M. & Shand, P.J. (2000). Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. *Meat Science*. 55, 223-231.
- Bos, M.A. & van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review, *Advances in Colloid and Interface Science*. 91, 437-471.
- Bouaouina, H. Labbafi, M. Desrumaux, A. Vial, Ch. Durosset, P. & Bérot, S. (2005a). Impact des conditions d'émulsification sur l'élaboration de mousses laitières type « topping ». *Journal of Science des Aliments*. 25, 353-366.
- Bouaouina, H. Labbafi, M. Desrumaux, A. Djelveh, G. Valentini, C. Schorsch C. & Bérot, S. (2005b). Effet de la formulation sur l'élaboration de mousses laitières de type « topping », *Journal of Science des Aliments*. 25, 367-380.
- Camacho, L. Cruz, A. Castro, R. Casals, C. & Perez-Gil, J. (1996). Effect of pH on the interfacial adsorption activity of pulmonary surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 5, 271-277.
- Campbell, G. & Mougeot, E. (1999). Creation and characterisation of food products. *Trends in Food & Technology*. 10, 283-296.
- Chatton, U. Arunee, A. & Alan, E.B. (2007). Effects of hydrocolloid addition and high pressure processing on the rheological properties and microstructure of a commercial ostrich meat product “Yor” (Thai sausage). *Meat Science*. 76, 548-554.
- Cheftel, J.C. Cuq, J-L. & Lorient, D. (1985). Protéines alimentaires: Biochimie-Propriétés fonctionnelles-Valeur nutritionnelle-Modifications chimique. *TEC & DOC*. Paris, France.
- Chen, W.S. & Soucie, W.G. (1985). Edible Fibrous Serum Milk Protein - Xanthan Gum Complexes. *KRAFT Inc. assignee, US Patent*. 4:559,233.
- Chou, D.H. & Morr, C.V. (1979). Protein-water interactions and functional properties. *American Oil Chemists Society*. 56, 53-62.
- Coffman, C.W. & Garcia, W.W. (1977). Functional properties amino acid composition protein isolate from mug bean flour. *Journal of Food Technology*. 12, 473-484.
- Cuevas, .R Cheryan, M. & Porter, L.V. (1982a). Performance of a Scraped-Surface Heat Exchanger Under Ultra High Temperature Conditions: A Dimensional Analysis. *Journal of Food Science*. 47, 619-625.
- Cuevas, .R. Cheryan, M. & Porter, L.V. (1982b). Heat transfer and thermal process design in scraped- Surface Heat Exchanger. *Journal of Food Science*. 78, 49-56.
- Culioli, J. Valéris, B. DeLamballerie, M. & Ouali, A. (1990). Propriétés gélifiantes des protéines myofibrillaires et de la myosine. *Journées Chercheurs Viande*, Paris V.P.C .

- Cuvelier, G. & Michon, C. (2003). Remplacer la gélatine : quelle fonctionnalité ? In *Proceeding of Polymerix*, Renne, France, 1-9.
- Dagorn-Scaviner, C. Gueguen, J. & Lefebvre, J. (1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviours. *Journal of Food Science*. 52, 335-41.
- Dailloux, S. Djelveh, G. Peyron, A. & Oulion, C. (2002). Rheological behavior of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid-gel transition temperature. *Journal of Food Engineering*. 55, 35-39.
- Daufin, G. Escudier, J.P. Carrere, H. Bérot, S. Fillaudeau, L. & Decloux, M. (2001). Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry. *Institution of Chemical Engineers*. 79, 89-102.
- Davis, J. P. Foegeding, E. A. & Hansen, F. K. (2004), Electrostatic effect on the yield stress of whey protein isolates foams. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 34, 13-23.
- Delaitre, J.M. Lorient, D. & Bourgeois, C. (1984). Propriétés fonctionnelles du cruor bovin décoloré par voies chimique ou enzymatique. *Journal of Science des Aliments*. 4, 245 250.
- DeLamballerie, M. Fatima, Ch. Culioli, J. & Ouali, A. (1993). Gélification of protéines myofibrillaires bovines. *Journal of Science des Aliments*. 13, 237-247.
- Dickinson, E. & Stainsby, G. (1982). *Colloids in food*. Applied science publishers, England.
- Dickinson, E. (1992). *An Introduction to food colloids*. Great Britain, Oxford Science Publication, UK.
- Dickinson, E. (1996). *Les colloïdes alimentaires* (traduction française par J.L. Courthaudon et M. le Meste), Masson, Paris, France.
- Durand, P. (2005). In *Technologie des produits de charcuterie et des salaisons*. Edition, *TEC et DOC*, Paris.
- Dutta, A. Chengara, A. Nikolov, A. Wasan, D. & Campbell, B. (2004). Destabilization of aerated food products: effects of Ostwald ripening and gas diffusion. *Journal of Food Engineering*. 62, 177-184.
- Ettelaie, R. Dickinson, E. Du, Z. & Murray, B. (2003). Disproportionation of clustered protein-stabilized bubbles at planar air–water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 263, 47-58.
- Euston, S. R. & Hirst, R. (1999). Comparison of the concentration-dependent emulsifying properties of protein products containing aggregated and non–aggregated milk protein. *International Dairy Journal*. 9, 693-701.
- Famelart, M. H. Chapron, L. Piot, M. Brule, G. & Durier, C. (1998). High pressure induced gel formation of milk and whey concentrates. *Journal of Food Engineering*. 36, 149- 164.

- Fonkwe, L. G. & Singh, R. K. (1996). Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 31, 605-616.
- Fox, J.B. Ackerman, S.A. & Jenkins, R.K. (1983). Effect of anionic gums on the texture of pickled frankfurters. *Journal of Food Science*. 48, 1031-1035.
- Frentz, J.C. (1982). Encyclopédie de la charcuterie. Soussana, France.
- Galdston, M. Shah, D.O. & Shinowara, G.Y. (1969). Isolation and characterization of lung lipoprotein surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*. 29, 319-334.
- Gault, N. F. S. & Lawrie, R.A. (1980). Efficiency of protein extraction and recovery from meat industry by-products. *Meat Science*. 4, 167-190.
- Gómez-Juárez, C. Castellanos, R. Ponce-Noyola, T. Calderón, V. & Figueroa, J. (1999). Protein recovery from slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*. 70, 129-133.
- Gonzalez-Mendez, N.F. (1990). Mise en œuvre d'un procédé de foisonnement en continu en échangeurs de chaleur à surface raclé. *Thèse Université Blaise Pascal, France*.
- Gonzalez-Perez, S. Merck, K.B. Vereijken, J.M. Vav Koningsveled, G.A. Gruppen, H. & Voragen, A.G.J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 1713-1719.
- Hall, G.M. (1996). In methods of testing protein functionality. Blackie Academic and Professional, London.
- Halling, P.L. (1981). Protein-stabilised foams and emulsions. *C.R.C Crit. Rev Food Science and Nutrition*. 15, 55-203.
- Haluc, T. (1984). Emulsifying Capacity and stability of Goat, Waterbuffalo, Sheep and Cattle muscle proteins. *Journal of Food Science*. 49, 168-171.
- Hanselmann, W. & Windhab, E. (1999). Flow characteristics and modelling of foam generation in a continuous rotor stator mixer. *Journal of Food Engineering*. 38, 393-405.
- Härröd, M. (1986). Scraped surface heat exchangers. A literature survey of flow patterns, mixing effects, residence time distribution, heat transfer and power requirements. *Journal of Food Process Engineering*. 9, 1-62.
- Hill, S.E. (1986). Processing and functional properties of bovine plasma. *These à l'Université de Loughborough*.
- Hoffman, K. (1975). Un nouvel appareil pour déterminer la liaison d'eau de la viande: le volumétrie capillaire. *Fleischwirtschaft*, 1, 25-29.

- Hunter, J.R. (1987). *Foundation of Colloid Science*, Oxford Science Publications, Royaume-Uni.
- Hutton, C.W. & Campbell, A.M. (1981). Water and fat absorption. In J.P Cherry and protein functionality in foods. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, D.C. 177-200.
- Jelen, P. Earle, M. & Edwardson, W. (1979). Recovery of meat protein from alkaline extracts of beef bones. *Journal of Food Science*. 44, 327-331.
- Kato, A. & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*. 624, 13-20.
- Kato, A. Fujishige, T. Matsudomi, N. & Kobayashi, K. (1985). Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurement. *Journal of Food Science*. 50, 56- 62.
- Katzbauer, B. (1998). Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*. 59, 81-84.
- Kelco. Ko, (1996). Xanthan Gum. Natural Biogum for Scientific Water Control. 6th edition.
- Kilara, A. (1984). Standardization of methodology for evaluating whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 67, 2734-2744.
- Kinsella, J.E. (1976), Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Crit. Rev. Food Science and Nutrition*. 7, 219-280.
- Kitabatake, N. & Doi, E. (1982). Surface tension and foaming of protein solutions. *Journal of Food Science*. 47, 1218–1221.
- Kowalski, M.S Vining, G.G. & Borror, C.M. (2006). Modifying a central composite design to model the process mean and variance when there are hard-to-change factors. *Applied Statistics*. 55, 615-630.
- Kroezen, A.B.J. & Groot –Wassink, J. (1986). Foam generation in a rotor-stator mixers. *Journal of Society of Dyers and Colourists*. 102, 397-402.
- Kroezen, A.B.J. & Groot –Wassink, J. (1987). Bubble size distribution and energy dissipation in foam mixers. *Journal of Society of Dyers and Colourists*. 103, 386-394.
- Kroezen, A.B.J. Groot –Wassink, J. & Bertlein, E. (1988a). Foam generation in a rotor-stator mixer. *Chemical Engineering and Processing*. 24, 145-156.

- Kroezen, A.B.J. Groot –Wassink, J. & Schipper, C.A. (1988b). The flow properties of foam. *Journal of Society of Dyers and Colourists*. 104, 393-400.
- Labbafi, M. Bouaouina, H. Vial, Ch. Djelveh, G. Picgirard, L. Casalinho, J. & Schorsch, C. (2005). Impact des technologies et des conditions opératoires du foisonnement sur l'élaboration de mousses laitières de type « topping ». *Journal of Science des Aliments*. 25, 381-395.
- Labbafi, M. Djelveh, G. & Vial, Ch. (2007). Development of an on-line optical method for assessment of the bubble size and morphology in aerated food products. *Food Chemistry*. 100, 454-465.
- Ledward, D. A. & Lawrie, R. A. (1984). Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 34, 223-228.
- Ledward, D.A. (1994). Protein-polysaccharide interactions. In: Protein Functionality in Food Systems. Hettierachchy, N.S. & Ziegler, G.R. (Eds.), Marcel Dekker Inc., NY, 225-259.
- Li-Chan, E. Nakai, S. & Wood, D.F. (1984). Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *Journal of Food Science*. 49, 345-350.
- Lurena-Martinez, M.A. Vivar-Quintana, A.M. & Revilla, I. (2004). Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Science*. 68, 383-389.
- Ma, C-Y. & Harwalkar, V.R. (1990). Instrumentation and techniques of thermal analysis in food research in Thermal Analysis of foods (eds V.R. Harwalker et C-Y . Ma) Elsevier Applied Science, London, 1-15.
- Maingonnat, J.F. Benezech, T. & Corrieu, G. (1985). Performances thermiques d'un échangeur de chaleur à surface raclée traitant des produits alimentaires newtoniens et non newtoniens. *Revue Générale de Thermique*. 24, 299-304.
- Marshall, W.H. Duston, T.R. & Carpenter, Z.L. (1975). A simple method for emulsion end-point determinations. *Journal of Food Science*. 40, 896-901.
- Masselot, A. (2005). Master de Nutrition et Sciences des Aliments, Extraction et valorisation des protéines des sous-produits animaux.
- Masters, K. (1976). Spray Drying, 2nd ed., Geo Goodwin, London, UK.
- McClements, D.J. (1995). Advances in the ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technologie*. 6, 293-299.
- McClements, D.J. (1999), Food emulsions ;Principles, practice, and techniques.CRC Press LLC.

- Mittal, G .S. & Barbut, S. (1994). Effects of carrageenans and xanthan gum on the texture and acceptability of low fat frankfurters. *Journal of Food Processing and Preservation*. 18, 201-216.
- Mohan, M. Ramachandran, D. Sankar, T.V. & Anandan, R. (2008). Physicochemical characterization of muscle proteins from differnt regions of mackerel (Rastrelliger Kanagurta). *Food Chemistry*. 106, 451-457.
- Molina, E. Papadopoulou, A. & Ledward, D.A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*. 15, 263-269.
- Montgomery, D. C. (2001). Design and analysis of experiments (5th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Morris, E.R. (1977). Molecular Origin of Xanthan Solutions Properties. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symposium, Sandford P.A. & Laskin A. (Eds.), American Chemical Society, Washington D.C. 45, 81-89.
- Morris, V.J. (1995). Bacterial Polysaccharides. In: Food Polysaccharides and Their Applications, Chap. Stephen A.M. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York.11, 341-375.
- Moure, A. Dominguez, H. Zuniga, M.E. Soto, C. & Chamy, R. (2002). Characterisation of protein concentrates from pressed cakes of *Gueniva avellana* (Chilean hazelnut). *Food Chemistry*. 78, 179-186.
- Müller-Fischer, N. Suppiger, D. & Windhab, E.J. (2007). Impact of static pressure and volumetric energy input on the microstructure of food foam whipped in a rotor-stator device. *Journal of Food Engineering*. 80, 306-316.
- Müller-Fischer, N. & Windhab, E.J. (2005). Influence of process parameters on microstructure of food foam whipped in a rotor-stator device within a wide static pressure range. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 263, 353-362.
- Nabetani, H. Abbott, P. & Kleiman, R. (1995). Optimal separation of jojoba protein using membrane processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 34, 1779-1788.
- Nakai, S. (2003). Measurement of protein hydrophobicity. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. B5.2, 1-13.
- Narchi, I. (2009). Etude du procédé de foisonnement en continu des milieux modèles: Interaction formulation-procédé sur les propriétés du produit fini. *Thèse, Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique*.
- Nath, J.P. & Narasingarao, M.S. (1981). Functional properties of guar proteins. *Journal of Food Science*. 46, 1255-1259.

- Noordman, T. R. Ketelaar, T. H. Donkers, F. & Wesselingh, J. A. (2002). Concentration and desalination of proteins solutions by ultrafiltration. *Chemical Engineering Science*. 57, 693-703.
- Nuckles, R. O. Smith, D. M. & Merkel, R. A. (1990). Meat by-product protein composition and functional properties in model systems. *Journal of Food Science*. 55, 640-643.
- O'Neill, E., Mulvihill, M.S. & Morrissey, P. A. (1989). Surface properties of muscle protein extracts. *Meat Science*. 25, 1-10.
- O' Neill, E. Morrissey, P.A. & Mulvihill, M.S. (1989). The effects of pH and heating on the surface activity of muscle proteins. *Food Chemistry*. 34, 295-307.
- Ozimek, G. Jelen, V. Ozimek, L. Sauer, W. & McCurdy, S.M. (1986). A comparison of mechanically separated and alkali extracted chicken protein for functional and nutritional properties. *Journal of Food Science*. 51, 749-753.
- Pearce, K.N. & Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26, 716-723.
- Petrucelli, S. & Anon, M.C. (1994). Relationship between the method of obtention of the structure and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 2170-2176.
- Pettitt, D.J. (1980). Xanthan Gum. In: Food Hydrocolloids, Glicksman M. (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton. 128 - 149
- Poma, J.P. (1984). Les échangeurs à surface raclée pour le caisson des produits carnés. *Filière Viande*. 72, 65-67.
- Pozrikidis, C. (2002). Expansion of two-dimensional foam. *Engineering Analysis with Boundary Elements*. 26, 495-504.
- Radu, A. (2007). Etude de l'influence des particules solides sur le foisonnement en continu des formulations modèles alimentaires. *Rapport Master, Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique*.
- Ragab, D.D. Elfadil, M. Babiker, E. & Eltinay, H.A. (2004). Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and or salt concentration. *Food Chemistry*. 84, 207-212.
- Raymundo, A. Empis, J. & Souso, I. (1998). Method to evaluate foaming performance. *Journal of Food Engineering*. 36, 445-452.
- Ryan, T. P. (2007). Modern Experimental Design. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Sagis, L.M. Prins, A. Mostert, A. & Linden, E.V. (2001). Effect of copper ions on the drainage stability of foams prepared from egg white. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 180, 163-172.

- Samant, S.K. Singhal, R.S. Kulkarni, P.R. & Rege, D.V. (1993). Review, Protein - Polysaccharide Interactions: A New Approach in Food Formulations. *International Journal of Food Science & Technology*. 28, 547-562.
- Sathe, S.K. & Salunkhe, D.K. (1982). Functional properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) proteins. *Journal of Food Science*. 47, 503-509.
- Sathe, S.K. Hamaker, B.R. Sze-Tao, K.W.C. & Venkatachalam, M. (2002). Isolation, purification and biochemical characterisation of a novel water soluble protein from Inca peanut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4096-4908.
- Sato, T. Norisuye T. & Fujita, H. (1984a). Double-stranded helix of xanthan in dilute solutions: evidence from light scattering. *Polymer Journal*. 16, 341-350.
- Sato, T. Kojima, S. Norisuye, T. & Fujita, H. (1984b). Double-stranded helix of xanthan in dilute solutions: further evidence. *Polymer Journal*. 16, 423-429.
- Satterlee, L.D. Zachariah B. & Levin, E. (1973). Utilisation of high protein tissue powders as a binder/extender in meat emulsions. *Journal of Food Science*. 38, 306-309.
- Schorsch, C. Garnier, C. & Doublier, J.L. (1997). Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: Comparisons of guar gum with locust bean gum. *Carbohydrate Polymers*. 34, 165-175.
- Shrestha, M. K. Peri, I. Smirnoff, P. Birk, Y. & Golan-Goldhirsh, A. (2002). Jojoba seed meal proteins associated with proteolytic and protease inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5670-5675.
- Soucie, W.G. & Chen, W-S. (1986). Edible xanthan gum-protein fibrous complexes, *US Patent Application*, Kraft, Inc. 4, 563-360.
- Srinivasan, M. Singh, H. & Munro, P. (2000). The effect of sodium chloride on the formation and stability of sodium caseinate emulsions. *Food Hydrocolloids*. 14, 497-507.
- Swift, C.E. Lockett, C. & Fryer, A.J. (1961). Comminuted meat emulsions: the capacity of meat for emulsifying fat. *Food Technology*. 15, 68-72.
- Swingler, G.R. & Lawrie, R.A. (1979). Improved protein recovery from somme meat industry by-products. *Meat Science*. 3, 63-73.
- Syrbe, A. Bauer, W. & Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems; An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*. 8, 179-193.
- Tejada, M. Borderias, A.J. & Jiménez- Colmenero, F. (1987). Myofibrillar and sarcoplasmic proteins: their role in alterations in certain functional properties of muscle during frozen storage, in Proceeding of the IUFoST International Symposium Chemical Changes during

- Food Processing, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIS), Valencia, 103-111.
- Taneva, S.G. Stewart, J. Taylor, L. & Keough, K.M.W. (1998). Method of purification affects some interfacial properties of pulmonary surfactant proteins B and C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *International Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*. 1370, 138-150.
- Thaïudom, S. & Goff, H.D. (2003). Effect of γ -carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures. *International Dairy Journal*. 13, 763-771.
- Thakur, R. K. Vial, Ch. & Djelveh, G. (2003b). Foaming of commercial grade food products in a continuous stirred column. *International Group of Chemical and Process Engineers and Material Scientist*. 81, 1083-1089.
- Thakur, R. K. Villette, C. Aubry, J.M. & Delaplace, G. (2008). Dynamique emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. *Colloids et Surfaces*. 315, 285-293.
- Tolstoguzov, V.B. Izjumov, D.B. & Grinberg, V.T. (1974). Method of making protein-containing foodstuffs resembling minced-meat, US Patent Application. 3, 829-587.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein - Polysaccharide Interaction. In: Food Proteins and their Applications, Damodaran S. & Paraf A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York. 171-198.
- Van Boxtel, L.B.J. & De Fiellietaz Goethart, I. (1983). Heat transfer to water and some highly viscous food systems in a water-cooled scraped surface heat exchanger. *Journal of Food Process Engineering*. 7, 17 – 35.
- Van Boxtel, L.B.J. & De Fiellietaz Goethart, I. (1984). Heat transfer in a scraped surface heat exchanger during cooling of some highly viscous food products in thermal processing and quality of foods, Zeuthen P., Cheftel J.C., Eriksson C., Jul M., Leniger H., Linko P., Varela G., Vos G., Elsevier Applied Science Publishers, London, New York. 450-458.
- Vega, C. Dalgleish, D.G. & Goff, H.D. (2005). Effect of κ -carrageenan addition to dairy emulsions containing sodium caseinate and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*. 19, 187-195.
- Walstra, P. (1968). Estimating globule-size distribution of oil-in-water emulsions by spectroturbidity. *Journal of Colloid Interface*. 27, 493-498.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*. 48: 333-349.
- Wang J.C. & Kinsella, J.E. (1976). Functional properties novel proteins alfalfa leaf proteins. *Journal of Food Science*. 41:286-292.
- Warr, R.G. Hagwood, S. Buckley, D.I. Crisp, T.M. Schilling, J. Benson, B.J. Ballard, P.L. Clements, J.A. & White, R.T. (1987). Low molecular weight human pulmonary surfactant

- protein (SP5): isolation, characterization and cDNA and amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Science*. 84, 7915-7919.
- Webb, N.B. Ivey, F.J. Craig, H.B. Jones, V.A. & Monroe, R.J. (1970). The measurement of emulsifying capacity by electrical resistance. *Journal of Food Science*. 35, 501-503.
- Webster, J.D. Ledward, D.A. & Lawrie, R.A. (1982). Protein hydrolysates from meat industry by-products. *Meat Science*. 7, 147–157.
- Whiting, R.C. (1984). Stability and gel strength of Frankfurter batters made with reduced NaCl. *Journal of Food Science*. 49:1350-1354.
- Windhab, E.J. (1991). Zur Technologie geschäumter Stoofsystem im Lebensmittelbereich – Teil II. *Lebensmitteltechnik*. 4,181-183.
- Xiong, Y. L. Noel, D. C & Moody, W. G. (1999). Textural and sensory properties of low-fat beef sausages with added water and polysaccharides as affected by pH and salt. *Journal of Food Science*. 64, 550-554.
- Xiong, Y.L. Lou, X. Wang, H. Moody, W.G & Harmaon, R.J. (2000). Protein extraction from chicken myofibrils irrigated with various polyphosphate and NaCl solutions. *Journal of Food Science*. 65.
- Xu, L. & Diosady, L.L (1994). Functional properties of Chinese rapeseed protein isolates. *Journal of Food Science*. 59, 27-30.
- Yada, R.Y. (2004). In proteins in food processing. England, Woodhead Publishing Limited.
- Young, S.L. Martino, M. Kienzle-Sterzer, C. & Torres, A. (1994). Potentiometric Titration Studies on Xanthan solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 54, 121-127.
- www.fao.org/docrep
www.chimie-biochimie.umoncton.ca):
www.vet-lyon.fr

Annexe

Protocoles de fabrication de saucisse de Starsbourg (type pâte fine 1^{ère} prix)

Le tableau (1) présente la composition de l'émulsion utilisée pour la préparation de la pâte fine de 1^{ère} prix. Nous avons préparé 10Kg de la pâte fine.

Tableau (1) : La composition de l'émulsion de saucisse de 1^{ère} prix

Eau+glace	25%
Epaule 3D	32%
VSM dinde	20%
Gras dur (80 %)	23%
Sel nitrité	18 g/kg
Phosphates	5 g/kg
Poivre blanc	2 g/kg
Ail	1 g/kg
Coriande	2 g/kg
Dextrose	5 g/kg
Lactose	5 g/kg
Plasma	10 g/kg
Caséinates	10g/Kg

Le protocole de fabrication de la pâte fine est la suivante :

Dans un premier temps les épaules 3D, la VSM de dinde et le gras dur ont été hachés en petits morceaux. Ensuite, ces produits ont été mêlés à l'aide d'une couterie jusqu'à l'obtention d'une pâte fine homogène. La double enveloppe de l'appareil assure que température en fin de cutterage ne dépasse pas 12°C.

Ensuite, la mûlée a été transportée dans l'appareil de poussage, et le poussage de la mûlée a été réalisé dans un boyau cellulosique pellable (diamètre 19 millimètres).

Ensuite, les saucisses préparées ont été subies quatre cycles de cuisson selon le barème suivant :

- 10 minutes à 40°C et de 55% d'hydrométrie.
- 25 minutes à 55°C et de 60% d'hydrométrie.
- 25 minutes à 73°C et de 80% d'hydrométrie.
- 2 min à 10°C et de 10% d'hydrométrie.

Après la cuisson, les saucisses ont été refroidies rapidement dans un frigo alimentaire à 4°C. Et la dernière étape consiste au pelage des saucisses avant le conditionnement sous-vide.

Protocoles de fabrication de la saucisson cuit

La composition de l'émulsion utilisée pour la préparation de saucisson cuit est présentée en tableau (2). Les ingrédients émulsifiants (Na-CN) sont incorporés dans la farce « pâte fine 1^{er} prix » avec les mêmes concentrations.

Tableau (2) : La composition de l'émulsion de saucisson cuit

pâte fine 1^{er} prix	30%
Epaule 3D	56%
Gras dur (80 %)	14%
Sel nitrité	18 g/kg
Poivre blanc	2 g/kg

Le protocole de fabrication est la suivante:

Après le hachage des épaule 3D et gras durs en grosse morceaux, ces produits ont été mélangé avec la pâte fine 1^{er} prix. La mée a été ensuite poussée en boyau cellulosique et puis est subi à des quartes cycles de cuisson expliquée précédemment. Finalement, les saucissons ont subis un refroidissement rapide avant qu'ils soient conditionnés sous-vide.

Liste des travaux réalisés pendant la thèse

Publication dans des revues à comité de lecture

- **Darine Selmane**, Christophe Vial, Gholamreza Djelveh, (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: influence of operating conditions on functional properties. *Journal of Meat Science*, volume 79, 640-647.
- **Darine Selmane**, Christophe Vial, Gholamreza Djelveh, (2010). Production and properties of meat protein concentrates obtained by extraction from beef lungs. *Journal of Meat Science*, volume 84, 315-322.
- **Darine Selmane**, Vial Christophe, Djelveh Gholamreza. Emulsification properties of proteins extracted from beef lungs in the presence of xanthan gum using a continuous rotor/stator system. *Journal LWT-Food Science and Technology* (soumis).

Communications dans des conférences nationales et internationales

- **Darine Selmane**, Christophe Vial, Gholamreza Djelveh. Emulsification in batch and Continuous system of protein extracted from beef lung; comparison with sodium caseinates. *SFGP 2009 XIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés*, 14-16 Octobre 2009, Marseille, France.
- **Darine Selmane**, Christophe Vial, Gholamreza Djelveh. Emulsification en continue de formulations modèles à base de protéines extraites de poumon de bœuf: effet du xanthane et des conditions opératoires. *12èmes Journées "Sciences du Muscle et Technologies des Viandes"* 8 et 9 octobre 2008, Tours, France.
- **Darine Selmane**, Christophe VIAL, Eric Lemoine, Véronique Santé-Lhoutellier, Alain Peyron et Gholamreza Djelveh. Extraction des protéines des résidus d'abattage : étude des propriétés fonctionnelles. *SFGP 2007, XIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés*, 2007, Saint Etienne, France
- **Darine Selmane**, Vial Christophe, Djelveh Extraction and valorisation of the proteins of slaughterhouse by-products: Study of their functional properties. *Intensive Processing for the Biomaterials*, 20-23 August 2007, SINAIA, Roumanie.
- **Darine Selmane**, Masselot Audrey, Vial Christophe, Lemoine Eric, Djelveh Goukamereza, Santé Véronique, Peyron Alain. Valorisation de sous-produits animaux sous formes d'ingrédients alimentaires. *COFrRoCA 2006, quatrième colloque Franco-Rumaine de chimie appliquée*, 28 juin-1 juillet 2006, ENSCCF, Clermont-Ferrand, France.

Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties

Darine Selmane*, Vial Christophe, Djelveh Gholamreza

LGCB, Blaise Pascal University, 24 avenue des Landais, BP 206, 63174 Aubière Cedex, France

Received 2 May 2007; received in revised form 19 October 2007; accepted 24 October 2007

Abstract

This study investigated the extraction and functional properties of proteins from slaughterhouse by-products: pork lungs, beef lungs and mechanically deboned chicken meat (MDCM). The extraction yield was investigated as a function of pH, temperature and time. Membrane technology was used for purification of proteins from pork and beef lungs, while for MDCM a method based on PI was applied. In the three cases, yields of protein recovery were between 48 and 55% (w/w). The functional properties of the protein concentrates were compared to those of some commercial ingredients. Proteins from pork lungs and MDCM exhibited better gelling properties than egg white and beef plasma, while beef and pork lungs displayed very good emulsifying properties, similar to Na-caseinates. As the methods developed are easy to scale-up, the use of by-product proteins at industrial scale appears to be an interesting opportunity to obtain added value slaughterhouse by-products.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Slaughterhouse by-products; Meat proteins; Protein extraction; Functional properties

1. Introduction

In the last decades, offal consumption has widely decreased in Western Europe, which has induced a rapid growth of the amounts of slaughterhouse by-products dedicated to pet food. This trend has been reinforced by the appearance of “mad cow” disease, also called bovine spongiform encephalopathy (BSE) that has given consumers a negative brand image of offal and has strongly restricted the use of animal meals in pet food. As a result, increasing amounts of slaughterhouse by-products available for human consumption and pet food have to be incinerated now. This leads not only to additional production costs, but incineration has a negative impact on the environment and maybe on health. The consequence is either an increase of the price of meat and meat products, or a reduction of

their added value, while their human consumption tends to decrease in Western Europe.

For economic and environmental reasons, it is therefore necessary to find new ways to obtain increased value of slaughterhouse by-products. For example, these by-products exhibit a high protein content, between 15 and 20% (w/w), with many essential nutrients such as amino acids, minerals, vitamins and fatty acids, (Liu, 2002). Some of them could also present interesting functional properties, but these have generally not been explored. One can particularly stress the difference between the respective situations of the meat and the dairy industries. Indeed, the added value of the milk and cheese by-products has grown rapidly: the whey which polluted the rivers in the past is now treated using membrane technology (such as microfiltration and ultrafiltration) for purification and concentration to extract high value-added proteins with excellent nutritional and functional properties, even used in infantile and clinical foods. Consequently, a new way to increase the value of slaughterhouse by-products would be to extract

* Corresponding author. Tel.: +33 0 479407954; fax: +33 0 473407829.
E-mail address: darineslmane@yahoo.com (D. Selmane).

their proteins for use as functional ingredients in meat products, for instance as emulsifying or gelling agent, using similar technologies. The key problem is however that there is little information on the properties of proteins of slaughterhouse by-products and on the methodology to extract and purify these proteins without considerably altering their properties. Actually, commercial success has only been achieved in the development of methods for collection and processing of blood into dried blood plasma and red cells (Gómez-Juárez, Castellanos, Ponce-Noyola, Calderón, & Figueroa, 1999; Ledward & Lawrie, 1984). It is well known now that blood can be concentrated by ultrafiltration (Dailloux, Djelveh, Peyron, & Oulion, 2002; Noordman, Ketelaar, Donkers, & Wesselingh, 2002) or by spray drying (Masters, 1976). By contrast, progress in the extraction and purification of other meat proteins is limited, especially when one considers only the methods that can be applied at industrial scale. Gault and Lawrie (1980) reported the extraction, isolation and production of lung and stomach protein fibrous meat analogues. Similarly, Nuckles, Smith, and Merkel (1990) reported the fractionation of mechanically deboned chicken meat (MDCM) proteins. To better maintain the functionality of meat proteins, Ledward and Lawrie (1984), and Fonkwe & Singh (1996) suggested the use of enzymatic hydrolysis. For purification and concentration of proteins from beef bones, Boles, Rathgeber, and Shand (2000) applied acid precipitation followed by dialysis. With regard to the functional properties of slaughterhouse by-products, Nuckles et al. (1990) investigated those of MDCM by adding MDCM proteins into standard recipes, while Boles et al. (2000) evaluated the effects of meat proteins on the texture of a finely comminuted sausage product.

In this paper, the objective was to investigate the influence of the methods and of their operating conditions on the extraction, purification and concentration of meat proteins from three slaughterhouse by-products, namely pork lungs, beef lungs and mechanically deboned chicken meat (MDCM) from chicken heads, in order to maximize protein recovery and to enhance protein functional properties for subsequent application as food ingredients. Three functional properties, namely gelling, emulsifying and foaming properties, of the resulting concentrates were compared to those of commercial ingredients from milk (whey proteins, Na-caseinates), egg white, blood (beef plasma) and soy.

2. Methods and materials

2.1. Raw materials

Raw materials: Pork lungs, beef lungs and MDCM from chicken heads were supplied by ADIV (Clermont-Ferrand, France). All of them were crushed in a Stephan grinder (Sympak, Germany) for 3 min at 3000 rpm, vacuum-packaged and frozen until used. Approximate composition was determined using AFNOR (French Association of Normalizations) procedures (dry matter: NF V04-401; meat

proteins: NF V4-407; collagen: NF V04-415; fat: NF V04-403). Commercial ingredients used in this study as reference materials for a comparison with the functional properties of meat proteins are summarized in Table 1.

2.2. Protein extraction

Protein extraction was conducted under mild conditions to maintain, as far as possible, their functional properties. Extraction was carried out on the by-products after thawing using a mixer Stephan UMC5 (Sympak, Germany) at 1100 rpm. For each test, 200 g of by-product per 1 L water (20% w/v) were homogenized for 5 min. Various conditions of pH (acidic pH \approx 4, neutral pH \approx 7, and alkaline pH \approx 9), temperature (20, 30 and 40 °C) and operation time (30 and 60 min) were studied. For pH adjustment, minute quantities of either a 37% HCl solution or a 5 M sodium hydroxide solution were used. The suspensions were then centrifuged at 10,000g for 15 min and the supernatants were saved for subsequent analyses.

The protein content of the extracts was determined by nitrogen analysis using a colorimeter Hach DR890 (Germany). The method consists of converting all nitrogen species into nitrate ions by an addition of persulfites in alkaline medium; nitrate ions react with the chromotropic acid in acidic conditions and form a yellow complex with a maximum absorbance near to 420 nm, the amount of which was measured by colorimetry. This method was preferred because it gave results similar to the standard Kjeldahl method, but was easier to handle. As in the standard method, protein content was deduced from nitrogen content by multiplying the nitrogen mass fraction by 6.25. Protein recovery was estimated by dividing the amount of proteins in the extracts by the amount of proteins in the by-products. For the solid products, protein content was measured using the standard methods of Section 2.1. This gave access to a mass balance on proteins, which was used to validate the measurements based on the colorimetric technique. Experiments were done in triplicate.

2.3. Protein purification and concentration

Solutions including solubilized meat proteins obtained in the extraction step were purified and concentrated using membrane technology including successive microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF). MF was used to filter colloidal and suspended particles, as well as bacteria, in the range 0.1–10 μ m, while UF was used to concentrate the solutes when their colloidal or molecular structure ranged between 1 and 100 nm (Fig. 1). MF and UF tests were carried out using a tangential flow laboratory unit Xlab-3 (Pall-Exekia, France). The filtration unit (Fig. 2) was equipped with Membralox® membranes (Pall-Exekia, France) formed by a single ceramic tube of 0.05 m² surface area; their average pore diameters were 1.4 μ m for MF and either 100 or 20 nm for UF, respectively. Filtration was

Table 1
List of commercial protein ingredients used for comparison with the functional properties of meat proteins

Commercial ingredient	Protein content (% w/w)	Brand name (supplier)
Egg white proteins	82	Louis François – Ingrédients Alimentaires (France)
Beef plasma	75	Vepro 75BC (Vapran, France)
Soy protein isolate	86	M98 (Protein Technologies International, France)
Whey protein isolate	88	Protarmor 865 (Armor Protéines, France)
Na-caseinates	87	α-116 (Soussana, France)

conducted at constant transmembrane pressure (2 bar) and constant retentate flow rates, which means decreasing permeate flow rates vs. time. A cryothermostat was used for controlling the temperature of the retentate. Solubilized meat proteins were expected to be recovered in the permeate for MF and in the retentate for UF.

Protein extracts were also concentrated by isoelectric precipitation using a 37% HCl aqueous solution for pH adjustment, followed by centrifugation at 5000g for 5 min. The precipitated fat–protein mixture was purified by extracting the lipids using an organic solvent of hexane and isopropanol (3:2, v/v). Lipid extraction was carried out under mechanical stirring for 1 h at 20 °C using a 1/5 mixture/solvent mass ratio. Finally, proteins were recovered by evaporation of residual solvent. The purification and concentration yields were calculated by dividing the weight of recovered proteins after each step by the weight of total proteins in the initial extracts. The overall protein recovery was deduced by combining the extraction, purification and concentration yields.

2.4. Functional properties of by-product proteins

Among the various functional properties, we chose to study the gelling, emulsifying and foaming properties of meat proteins, because of their key role in the preparation of meat products. Indeed, such products would constitute a “natural” market if protein ingredients extracted from by-products could be commercialized.

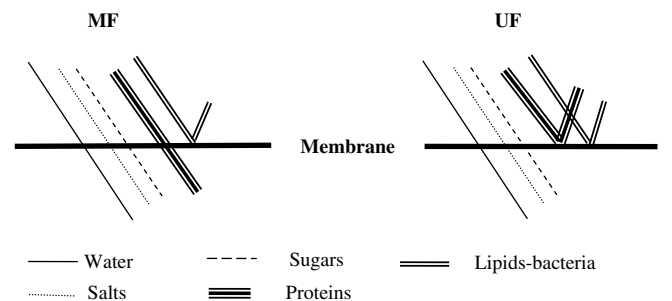


Fig. 1. Comparison between microfiltration and ultrafiltration.

2.4.1. Gelling properties

The objective was to determine the gelation temperature and the gel strength of standardized protein solutions obtained from by-products. Shear rheology was applied to estimate these two parameters. A stress-controlled rheometer (SR-5 from Rheometric Scientific, USA) equipped with a Peltier circulator system for temperature control was used. Dynamic oscillatory shear tests were carried out to analyze the viscoelastic response of 2% (w/v) protein solutions in term of storage shear modulus (G') using a plate–plate geometry of 40 mm diameter. Small amplitude deformation (1% strain) was applied at an oscillation frequency of 1 Hz and a 300 μm gap was imposed. The range of temperature studied was 20–80 °C using a temperature ramp of +2 °C/min. Gelation temperature was deduced from a break, i.e. a rapid increase, in the G' vs. T curve, while the gel strength was estimated by the maximum of the $G'(T)$ curve. Measurements were done in triplicate.

2.4.2. Foaming properties

Proteins are known to enhance and to stabilize foams. The foamability, was measured using the method described by Coffman and Garcia (1977). Standardized protein solutions at 2% (w/v) were placed in test tubes, then subjected to an intense mechanical stirring using a rotor–stator device (T25, Ultraturrax, Germany) for 2 min. Foaming ability was expressed using the FA parameter expressed in percentage was defined as follows:

$$FA [\%] = 100 \cdot \frac{V_f - V_i}{V_i} \tag{1}$$

in which V_i is the initial solution volume and V_f is the final volume after foaming. FA is often denoted “overrun” in food foam manufacturing. Foam stability was measured using the FS parameter that corresponded to the time necessary for halving the volume of foam immediately after

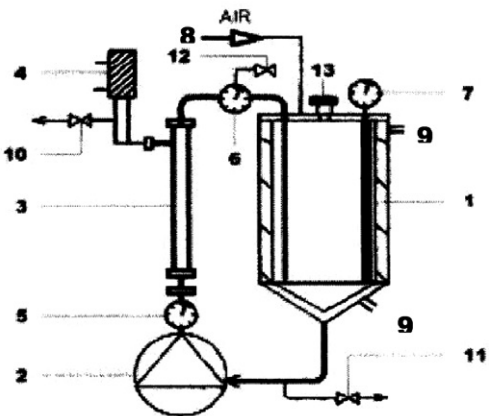


Fig. 2. Filtration unit. 1: jacketed feed tank; 2: centrifugal pump; 3: membrane support; 4: back-pulse system; 5 and 6: manometers; 7: thermostat; 8: air for tank pressurization; 9: inlet and outlet of the cooling/heating fluid; 10: regulation valve on permeate flux; 11: drain; 12: air purge valve; 13: feed tank inlet.

whipping. It is expressed in minutes. As a result, FA and FS increase when foam formation and foam stability are enhanced, respectively. Measurements were done in triplicate.

2.4.3. Emulsifying properties

As for foams, water-soluble proteins may form and stabilize O/W emulsions. The measurement of the emulsifying activity was performed as described by Moure, Dominguez, Zuniga, Soto, and Chamy (2002). Emulsions with standardized quantities of soluble proteins and oil phase were prepared. The emulsifying activity (EA) was determined from the turbidity of these emulsions, estimated by measuring the absorbance at 500 nm using a Mc2 UV–Vis spectrophotometer (Safas, Monaco). EA was deduced from the following equation:

$$EA = 2.33 \cdot A_0 \quad (2)$$

in which A_0 is the absorbance measured just after emulsion preparation. EA increases when droplet diameter decreases, as the emulsion absorbance is known to increase with enhanced oil dispersion. This is due simultaneously to the reduction of the average droplet size and the increase of droplet number at constant oil volume. The emulsion stability, ES, was determined by measuring the absorbance of these emulsions after 10 min. ES is expressed in minutes and is calculated by the following equation:

$$ES [\text{min}] = 10 \cdot \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (3)$$

in which A_{10} is the absorbance measured after 10 min. ES measures the rate of decrease of emulsion turbidity due to droplet coalescence and creaming, which are the key phenomena leading to emulsion destabilization. As a result, EA and ES increase when proteins favor emulsion formation and stabilization, respectively. Measurements were done in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. By-product analyses

The average compositions of by-products used in this work are listed in Table 2 in terms of dry matter, recoverable proteins, non-recoverable proteins (collagen) and lipids (column 2, 3, 4 and 5). Gelatin could be extracted from collagen by heating, however this treatment would

irreversibly denature all the other types of proteins. The column 6 in this table shows that pork and beef lungs constitute the most interesting by-products in terms of recoverable proteins/dry matters ratio. In particular, pork lungs exhibited the highest content of recoverable proteins and the best recoverable proteins/collagen ratio. Conversely, MDCM simultaneously has the lowest percentage of recoverable proteins and the highest lipid content, which could impact drastically on the operating conditions of the purification step.

3.2. Protein extraction

Experimental results show that pH is the key parameter of protein extraction. Fig. 3 illustrates the influence of pH on the extractability of proteins from the by-products at 20 °C and 60 min operation. It is clear that the isoelectric points (pI) of the main protein fractions of the three by-products lie in the acidic range and are lower than 6. For temperature, the best results were obtained at 20 °C for beef and pork lungs, but at 40 °C for MDCM. Finally, for operation time, the best yield was always achieved at 60 min, which corresponds to an acceptable compromise. As a conclusion, pork and beef lungs were subjected to extraction in similar operating conditions: pH = 9, 20 °C and 60 min, while only the optimum temperature, 40 °C, differed for MDCM. In these conditions, extraction yields were 75%, 64% and 83% (w/w) for pork lungs, beef lungs and MDCM, respectively. This is in accordance with the results of Gault and Lawrie (1980) who found that the solubilization of lung proteins reached a maximum of 60% (w/w) at pH 10.5. The difference in extraction yields between pork and beef lungs could be partly attributed to the denser collagen network in beef lungs hindering the solubilization of some proteins from the tissues. For MDCM, the effect of temperature could be explained by the increase of the fraction of melted fat with higher temperature, which could enhance protein solubilization. Conversely, higher temperature could lead to protein denaturation, as is confirmed later in section 3.4.1.

3.3. Protein concentration and purification

The performance of membrane technology can be estimated by measuring permeate flow rate vs. time. This measures also the kinetics of membrane fouling. Fig. 4 sketches the permeate flux during MF (1.4 µm) for the protein

Table 2
Composition of raw material and protein extracts before and after purification

By-products	Composition of raw material (% w/w)				Proteins/DM (%)	
	Dry matter	Proteins	Collagen	Lipids	Before extraction	After purification
Pork lungs	20.7 ± 0.4 ^a	14.4 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.4 ± 0.1	69.6 ± 2.8	78 ± 6.2
Beef lungs	21.5 ± 0.5	13.8 ± 0.3	4.1 ± 0.3	2.9 ± 0.2	64.1 ± 0.1	77 ± 5.3
MDCM	20.7 ± 0.2	9.1 ± 0.5	1.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2	43.9 ± 2.8	83 ± 7.6

^a Mean ± SD.

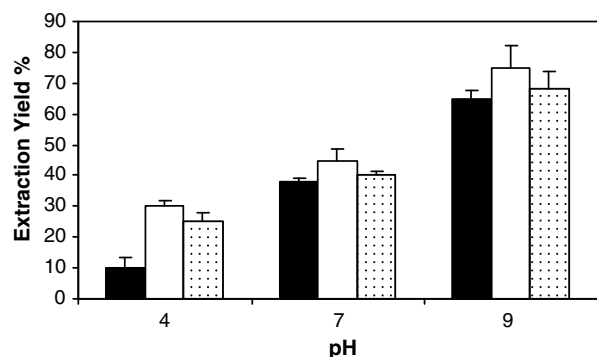


Fig. 3. Influence of pH on the extraction yield for beef lungs (■), pork lungs (□) and MDCM (▨).

extracts from pork lungs, beef lungs and MDCM. The curves show that the initial permeate flux is far higher for lungs extracts, between 240 and 280 L/(h.m²), than for MDCM extracts, about 90 L/(h.m²). For the three centrifuged solutions, membrane fouling leads to final values about 30–40 L/(h.m²), but the time to obtain these limits is less than 15 min for MDCM proteins, while it is more than 100 min for the two other protein solutions. The rapid membrane fouling with MDCM extracts can be attributed to the high amount of lipids: a fraction of the lipid phase may be solubilized by proteins and not removed by centrifugation. The same occurs for UF applied to MF permeates. Finally, the overall protein yield based on extraction, purification and concentration was 48% and 40% and 15% (w/w) for pork lungs, beef lungs and MDCM, respectively. These values were obtained using the 100 nm pore diameter UF membrane. With 20 nm pore diameter membranes, UF always took far longer for lung extracts, but the yields were only slightly increased (for example, the yield was 52% for pork lungs).

Table 2 (columns 6 and 7) compares the ratio of proteins/DM before and after purification. One should note that a large fraction of proteins were lost during the MF/UF step (about 15% w/w for pork and beef lungs and 65% w/w for MDCM) and that the majority was lost during MF, although MF membrane should not be a barrier for proteins. This means that the mild extraction condi-

tions in aqueous solutions used in this work are not able to solubilize all the protein fractions, which could however be expected. In particular, it is probably not possible to separate sufficiently the meat proteins from the lipid phase in MDCM, which explains why membrane processes fail at the MF/UF step for MDCM.

Since the majority of proteins were lost in the MF/UF step for MDCM, protein extracts were subjected to acid precipitation at pH 4 using minute addition of a 37% HCl solution, before concentration by centrifugation and purification by lipid extraction with organic solvent. The lipid extraction resulted in a loss of 15% w/w of the proteins. The final protein yield was 55% (w/w), which was roughly similar to the overall yields achieved with MF/UF treatments for pork and beef lungs. As a conclusion, protein extraction using mild conditions in order to maintain protein functionality is still possible even for lipid-rich by-products. An alternative method to MF/UF must however be used in the latter case. The comparison between columns 6 and 7 in Table 2 shows that proteins/DM ratio after purification in the case of MDCM is higher than that in the case of pork and beef lungs.

3.4. Functional properties of protein extracts

A comparative study of the functional properties of the protein concentrates obtained in this work was carried out using the reference ingredients detailed in Table 1. Concentrates from MF/UF were studied for beef and pork lungs, while only those recovered by acid precipitation were tested for MDCM. In this case, the properties of concentrated proteins (before lipid extraction by organic solvent) were compared to those of purified proteins (after lipid extraction). The reference ingredients cover the different types of protein ingredients (milk, egg, blood and vegetable proteins) available and are currently used as emulsifiers (such as Na-caseinates), foaming agents (such as egg white and whey proteins) and gelling agents (such as beef plasma and whey proteins).

3.4.1. Gelling properties

Fig. 5 illustrates the effect of temperature on the storage shear (elastic) modulus G' for commercial proteins. It appears that the gelling temperatures of beef plasma and egg white proteins are slightly higher than 60 °C and 70 °C, respectively. Conversely, Na-caseinates which are rather linear proteins with only weak tertiary and quaternary structures are not denatured in the range of temperatures studied and, consequently, do not exhibit any gelling capacity. These results are in accordance with those reported by the French Institute for Nutrition. *Dossiers scientifiques de l'Institut Français pour la Nutrition* (1997). For both egg white and beef plasma, the maximum G' value remains slightly lower than 17,000 Pa. Fig. 6 shows the effect of the temperature on the storage shear modulus G' for pork lung proteins using 100 nm and 20 nm membranes, and beef lung proteins. It can be seen

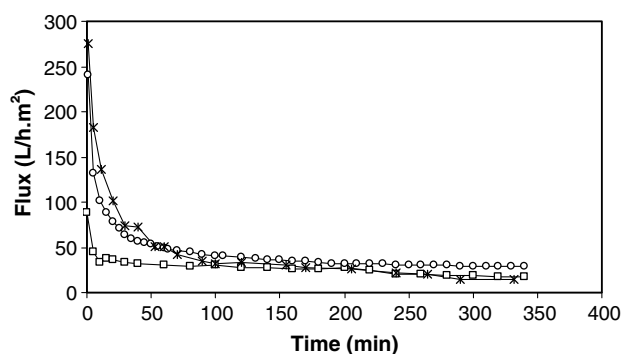


Fig. 4. Evolution of MF permeate flux vs. time for pork lungs (○), beef lungs (*) and MDCM (□).

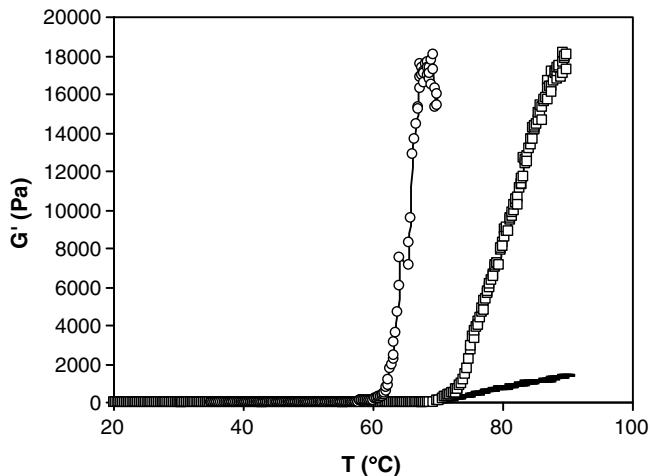


Fig. 5. Evolution of elastic modulus G' as a function of temperature for beef plasma (○), egg white proteins (□) and Na-caseinates (-).

that the proteins extracted from pork lungs and concentrated at 100 nm had a gelation temperature of about 45 °C and a gel strength around 35,000 Pa, but for those concentrated at 20 nm, the gelation temperature was about 58 °C and the gel strength around 30,000 Pa. For beef lungs, gelation temperature was around 60 °C, but the gel strength remained weak, about 12,000 Pa. Fig. 7 compares also the gelling properties of MDCM before and after lipid extraction. We note that the concentrated proteins before lipid extraction exhibited gelation at 65 °C, while gelation was delayed up to 70 °C for purified proteins. Similarly, gel strengths differed widely: about 45,000 Pa for concentrated proteins, but only 10,000 Pa for purified proteins. Thus, further purification induced lower gelling properties.

These results can be explained as follows. As expected, most meat proteins extracted from the by-products can be denatured easily by heating due to their highly-ordered secondary and tertiary structures; heat treatment should therefore lead to protein aggregation and favor water-holding, which constitutes the key steps of irreversible protein

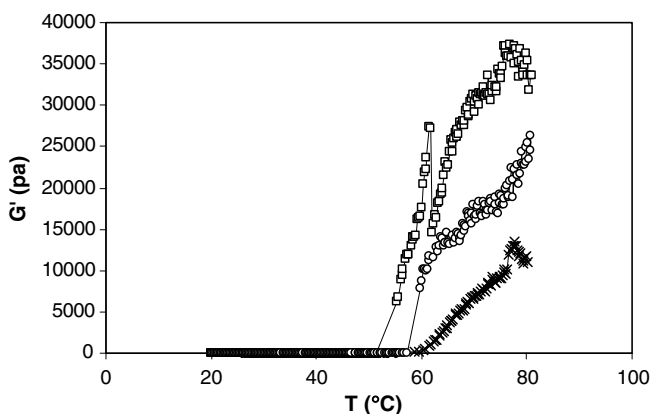


Fig. 6. Evolution of elastic modulus G' as a function of temperature for pork lungs proteins using 100 nm (□), 20 nm (○) and beef lungs proteins (*).

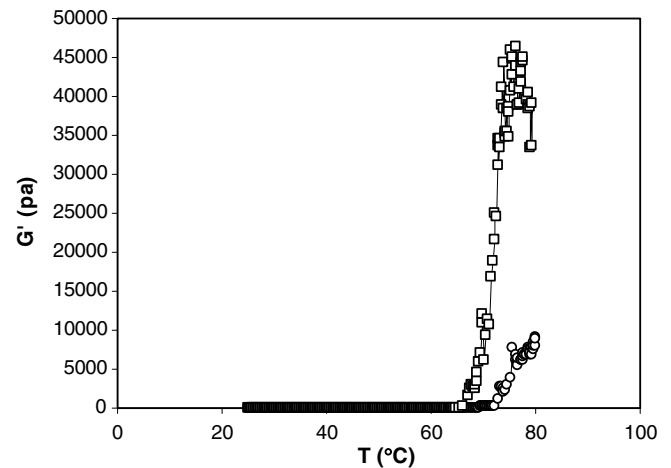


Fig. 7. Evolution of elastic modulus G' as a function of temperature for MDCM before lipid extraction (□) and after lipid extraction (○).

gels formed by heating. This explains why by-product proteins have very good gelling properties. For pork lung proteins, it can be seen that, despite higher protein recovery in the MF/UF process using a 20 nm membrane, the purified concentrate had lower gelling properties than those obtained with the 100 nm membrane. This confirms that functional properties are mainly due to one or two key protein fractions, while the other fractions either play a secondary role or may act as antigellation agents. Conversely, the difference between MDCM proteins before and after lipid extraction results probably from the fact that the proteins denatured during lipid extraction by organic solvent, are the most gelling proteins, which are probably the most efficient surface-active agents. Concentration is therefore a key step for the gelling properties of lung proteins, while it has a negative impact on those of MDCM.

Finally, we can infer that when rapid gelation is desired, proteins from pork lungs give the best results, far better than beef plasma that is considered as a very efficient gelling agent in meat products. Similarly, when high gel strengths are required, MDCM concentrates provide the highest strength, far higher than beef plasma. The conclusion is that MDCM protein concentrates before lipid extraction and pork lung extracts constitute valuable gelling agents that could be used in meat products. The results also imply that functional properties are strongly dependent on the treatments applied. The consequence is that the process must be optimized by taking into account not only the recovery yields, but also the resulting functional properties of the meat proteins.

3.4.2. Foaming properties

Table 3 (lines 2 and 3) summarize the foaming ability (FA) and the foaming stability (FS), respectively, of commercial and by-product proteins. Line 2 shows that, except for whey proteins, meat proteins exhibit the highest foaming ability: MDCM before lipid extraction had the best FA

Table 3

Foaming ability (FA), foaming stability (FS), emulsifying activity (EA), turbidity (A_{10}) and emulsion stabilizing (ES) of commercial ingredients and meat protein concentrates

Protein types	Whey proteins	Egg white proteins	Soy Protein isolate	Na-caseinates	Beef plasma	Pork lungs	Beef lungs	MDCM before lipid extraction	MDCM after lipid extraction
FA (%)	74.2 ± 2 ^a	42 ± 3	18 ± 3	45 ± 3	–	62 ± 3	47 ± 3	65 ± 2	35 ± 3
FS (min)	61 ± 3	237 ± 4	60 ± 2	19 ± 4	–	15 ± 3	60 ± 4	180 ± 3	30 ± 5
EA	0.42 ± 0.02	0.51 ± 0.06	–	0.56 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.85 ± 0.06	0.9 ± 0.1	0.40 ± 0.08	0.75 ± 0.06
A_{10}	0.29	0.23	–	0.19	0.12	0.40	0.37	0.16	0.25
ES (min)	33 ± 2	18 ± 3	–	15 ± 2	44 ± 3	19 ± 2	17 ± 2	17 ± 2	15 ± 4

^a Mean ± SD.

value (which is in agreement with the results on gelling properties in section 3.4.1), slightly better than pork lungs and beef lungs, while egg white proteins and Na-caseinates gave results similar to beef lungs.

Line 3 presents however a far different picture. Egg white proteins exhibit the highest foam stability, as expected, which justifies their wide use as a foaming agent in the food industry. Indeed, stability is a key process parameter, as food foams including egg white proteins are generally cooked (cakes, meringue...). All other proteins give FS values at least four times lower and cannot be compared to egg white proteins, except MDCM protein concentrates before lipid extraction that combine high FA and FS values. Although high interfacial properties were inferred for these concentrates in section 3.4.1, this result is however surprising because of the high fat content of these concentrates. Indeed, fat and especially partly soluble fat fractions (such as mono- and diglycerides) are known to be foam depressors because they compete with proteins at the air–water interface and may displace the adsorbed protein layer (Dickinson & Stainsby, 1982). In this case, it is first possible that this behavior is overshadowed by the high surface-activity of proteins. Another possibility is a stabilizing mechanism involving proteins and protein-coated fat droplets, as observed in whipped cream (Walstra, 2003), although there is no direct evidence supporting this assumption. As a conclusion, when abundant foams are desired, MDCM protein concentrates before fat extraction present very interesting foaming properties, similar to those of egg white proteins. Conversely, when foams with lower overrun have to be prepared, beef lungs proteins may also be used because they exhibit foaming properties close to those of whey proteins that are also sometimes used as foaming agents.

3.4.3. Emulsifying properties

Table 3 (lines 4, 5 and 6) illustrate the emulsifying activity (EA), turbidity (A_{10}) and the emulsifying stability (ES) respectively, of commercial and by-product proteins. Line 4 shows that Na-caseinates are the best emulsifying agents among the selected commercial ingredients, but it shows also that both pork and beef lungs proteins, as well as MDCM after lipid extraction, exhibit far higher EA values than commercial proteins. Contrary to the behavior

observed for gelation and foaming, lipid extraction improves the emulsifying properties of MDCM. This is undoubtedly due to the fact that lipid extraction permits the proteins to adsorb on O/W interfaces.

Line 6 shows however that by-product proteins do not exhibit the highest ES values, but that these are similar or even higher than those of Na-caseinates. Such a behavior is not surprising: the low ES values of good emulsifying agents mean only that coalescence is more likely to occur rapidly when the initial turbidity A_0 is high because of higher interfacial area and higher droplet number. If turbidity A_{10} was used for comparison, the results would confirm that pork and beef lungs are very interesting emulsifying agents that can replace Na-caseinates in meat products as emulsifiers (line 5). Conversely, it is probable that the protein fractions displaying the best emulsifying properties are already adsorbed in the MDCM concentrates before lipid extraction, while they are removed with the organic phase during solvent extraction, which explains why MDCM is less effective than the two other by-products.

4. Conclusion

In this work, methodologies for extracting proteins from slaughterhouse by-products under mild conditions in order to maintain their functional properties have been developed. They consist of batch extraction of ground by-products in aqueous solutions at fixed pH and temperature under mechanical stirring. This method is easy to scale-up and has provided good extraction yields on three by-products of between 64% and 83% (w/w), regardless of their protein/lipid mass ratio. Concentration and purification methods have been proposed. Membrane technology, already used in the dairy industry and also for plasma concentration, has been shown to be an interesting method for protein purification and concentration, but only when the lipid mass fraction of the by-product remains low, for example for beef and pork lungs. The recovery yields of proteins from the by-products were 48% and 53% (w/w), respectively. Otherwise, alternative methods that can be used at industrial scale have to be found. For MDCM, iso-electric precipitation was shown to be a versatile tool, when followed by lipid extraction using an organic solvent to

remove the lipids that were not eliminated by centrifugation. An overall recovery yield of 55% (w/w) was achieved, which was similar to other by-products with low lipid content using tangential filtration.

The analysis of the functional properties of the purified and concentrated protein extracts confirmed that some protein fractions had excellent functional properties that were not totally altered by extraction, purification and concentration. Some of them exhibited high functionality levels that were even higher than commercial ingredients. For example, pork lung and MDCM protein concentrates before solvent extraction had very high gel strengths, higher than beef plasma and egg white proteins, while pork lung extracts displayed a lower gelation temperature (about 45 °C), which can be useful in the manufacture of meat products. Similarly, pork and beef lungs were as good emulsifiers, as Na-caseinates. These results show that protein ingredients based on MDCM, pork and beef lungs could be used in meat products and replace ingredients from milk or soy. As the scale-up procedures of membrane processes and centrifugation are now well established, the use of by-product proteins as functional ingredients at industrial scale seems to be an interesting opportunity to raise the value of slaughterhouse by-products. However, the influence of membrane pore diameter in the UF step and lipid extraction using organic solvent on the functional properties of meat proteins show that further work is still needed to optimize process conditions, as better functionalities do not always correspond with the highest yield (for instance for pork lungs) or with the higher purity (e.g. for MDCM). A technico-economic analysis coupled to pilot-scale tests is still required to find a compromise between the added value resulting from the protein functional properties, the operating costs and the requirements for recovery yield and purification.

Acknowledgements

This work was supported by ADIV (Association de Développement de l'Institut de la Viande) and OFIVAL

(Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture) in France.

References

- Boles, J. A., Rathgeber, B. M., & Shand, P. J. (2000). Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. *Meat Science*, 55, 223–231.
- Coffman, C. W., & Garcia, W. W. (1977). Functional properties amino acid composition protein isolate from mug bean flour. *Journal of Food Technology*, 12, 473–484.
- Dailloux, S., Djelveh, G., Peyron, A., & Oulion, C. (2002). Rheological behaviour of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid–gel transition temperature. *Journal of Food Engineering*, 55, 35–39.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1982). *Colloids in foods*. London, UK: Applied Science Publishers.
- Fonkwe, L. G., & Singh, R. K. (1996). Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 31, 605–616.
- French Institute for Nutrition. Dossiers scientifiques de l'Institut Français pour la Nutrition, (Mai 1997). Dossier Scientifique N9 bis. Les protéines. Tome 2: Caractéristiques des différentes sources de protéines alimentaires.
- Gault, N. F. S., & Lawrie, R. A. (1980). Efficiency of protein extraction and recovery from meat industry by-products. *Meat Science*, 4, 167–190.
- Gómez-Juárez, C., Castellanos, R., Ponce-Noyola, T., Calderón, V., & Figueroa, J. (1999). Protein recovery from slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*, 70, 129–133.
- Ledward, D. A., & Lawrie, R. A. (1984). Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 34B, 223–228.
- Liu, D. C. (2002). Better utilization of by-products from the meat industry. <http://www.agnet.org/library/eb/515/>.
- Masters, K. (1976). *Spray drying* (2nd ed.). London, UK: Geo Goodwin.
- Moure, A., Dominguez, H., Zuniga, M. E., Soto, C., & Chamy, R. (2002). Characterisation of protein concentrates from pressed cakes of *Gueniva avellana* (Chilean hazelnut). *Food Chemistry*, 78, 179–186.
- Noordman, T. R., Ketelaar, T. H., Donkers, F., & Wesselingh, J. A. (2002). Concentration and desalination of proteins solutions by ultrafiltration. *Chemical Engineering Science*, 57, 693–703.
- Nuckles, R. O., Smith, D. M., & Merkel, R. A. (1990). Meat by-product protein composition and functional properties in model systems. *Journal of Food Science*, 55, 640–643.
- Walstra, P. (2003). *Physical chemistry of foods*. New York, USA: Marcel Dekker.



Production and functional properties of beef lung protein concentrates

Selmane Darine *, Vial Christophe, Djelveh Gholamreza

LGCB, Clermont Université/ENSICF, 24 av. des Landais, BP 206, 63174 Aubière Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2008

Received in revised form 16 February 2009

Accepted 22 March 2009

Keywords:

Beef lungs

Meat proteins

Protein extraction

Protein properties

Technofunctional properties

ABSTRACT

This work investigated the production and the properties of meat protein concentrates from beef lungs (BLPC) at pilot scale. Protein recovery and functional properties were compared to those of BLPC obtained using membrane technology in a previous work (Selmane, D., Vial, C., & Djelveh, G. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79, 640–647). An alkaline solubilisation method was applied for protein extraction, followed by pI precipitation for concentration. The physicochemical properties of BLPC such as molecular mass, solubility, surface hydrophobicity, surface tension and interfacial tension, as well as technofunctional emulsifying and foaming properties were determined. These were compared to those of commercial protein ingredients, such as sodium caseinates, whey protein isolates, egg white proteins and soy protein isolates. Results showed that proteins from BLPC included a low-molecular-weight fraction and exhibited good solubility and high hydrophobicity with small surface and interfacial tensions. This explained their excellent emulsifying activity, better than sodium caseinates, and their good foaming properties.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

In the last few decades, the amount of available meat by-products from slaughterhouses, meat processors and wholesalers has increased considerably. At the same time, traditional markets for edible meat by-products have gradually disappeared due to changing food habits and new health concerns among consumers in Western Europe. This prompted the meat processors to direct their marketing and research efforts towards non-human food uses, such as pet food and animal feed. However, in the early nineties, the use of animal flours in the pet food was prohibited due to the problems raised by the mad cow disease (bovine spongiform encephalopathy). This resulted not only in the loss of a valuable source of potential benefits for the producers, but it also induced a negative environmental effect due to the need for incineration of animal by-products. Additionally, the majority of these by-products exhibit high protein content, between 15% and 20% (w/w), and good nutritional properties due to the presence of many essential nutrients, such as amino acids, hormones, minerals, vitamins and fatty acids (Liu, 2002).

The development of techniques for the recovery and the utilisation of proteins from animal by-products has gained a considerable interest in the recent years. However, commercial success has only been achieved in the collection and the processing of blood into dried blood plasma and red cells (Gómez-Juárez, Castellanos,

Ponce-Noyola, Calderón, & Figueroa, 1999; Ledward & Lawrie, 1984). Efforts have been aimed at recovering proteins from meat by-products. For example, Fonkwe and Singh (1996) suggested the use of enzymatic hydrolysis to recover protein from mechanically deboned turkey residue. Similarly, Jelen, Earle, and Edvardson (1979) and Swingle and Lawrie (1979) used alkaline solutions for extraction of proteins, followed by acid precipitation to recover the proteins from several sorts of meat by-products, such as beef and pork lungs. The influence of lipid extraction for the purification of offal proteins was studied, for example, by Areãs (1985), while Boles, Rathgeber, and Shand (2000) described a method for protein extraction from beef bones.

However, only a few authors investigated the technofunctional properties of the extracts. These are often categorised in three groups for proteins: hydration (solubility, water absorption etc.), interfacial properties (emulsifying and foaming properties) and textural properties (gel strength etc.). Three kinds of factors affect the technofunctional properties of proteins. The first category is directly linked to the structure of the proteins (molecular mass, hydrophobicity, secondary and tertiary structure); the second group includes the physicochemical environment, such as temperature, ionic strength and pH; the last one involves the specific interactions between proteins and other ingredients or additives, such as polysaccharides and especially lipids, that can modify drastically protein properties (Arêas, Alcocer, & Mota, 1993). Among the few results available in the literature, many are connected to the effect of defatting of lung proteins with several solvents, first on their structure and solubility (Arêas et al., 1993), but also on

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 479407954; fax: +33 (0) 473407829.

E-mail address: darineslmane@yahoo.com (S. Darine).

their hydration and interfacial properties and on their use as food after texturisation through extrusion cooking (see, e.g., Bastos & Arêas, 1990). On the other hand, only the textural properties of finely comminuted sausage prepared using beef bone proteins were studied (Boles et al., 2000). As a result, it can be concluded that little is known on the technofunctional properties of beef lung proteins in particular.

In a previous work, Selmane, Vial, and Djelveh (2008) developed methodology for extracting proteins from slaughterhouse by-products such as Mechanically Deboned Chicken Meat (MDCM), pork and beef lungs with maintenance of their functional properties at pilot scale. The objective then was to purify and concentrate these proteins in order to maximise the protein content in dry matter. Experimental data showed that some fractions of concentrated and purified proteins exhibited excellent technofunctional properties. For example, pork and beef lungs proteins appeared to be as good emulsifiers as sodium caseinates. The results showed that protein concentrates extracted from MDCM, pork and beef lungs could be used in meat products and replace milk or soy proteins as functional ingredients. For MDCM, Selmane et al. (2008) highlighted however that a further purification of the meat protein concentrates decreased the interfacial properties, especially the removal of the lipids using solvent extraction, as in Bastos and Arêas (1990). This means that the most surface-active proteins were highly hydrophobic and were removed with the lipids. For beef lungs, concentration and purification steps were carried out using membrane techniques including microfiltration in Selmane et al. (2008). These techniques are efficient, but expensive due to the high equipment and operating costs. In practice, the operating costs result mainly from cleaning and maintenance of the membranes. As a consequence, it may be interesting from a technico-economical point of view to maximise the functional properties of meat protein concentrates after extraction in aqueous solution using low-cost techniques for purification and concentration, such as pl precipitation.

In this work, alkaline solubilisation has been used for protein extraction from beef lungs (BLPC), followed by acid precipitation for further purification and concentration. Operating parameters, such as temperature and extraction time, have been optimized to maximize protein recovery. The first objective was to show whether this process is able to provide protein concentrates from beef lungs simultaneously with a high protein recovery yield and high technofunctional properties. A comparison with the performance of membrane techniques investigated in a previous work (Selmane et al., 2008) was also carried out. The emulsifying and foaming properties of BLPC prepared by acid precipitation were compared to those of commercial proteins that can be considered as reference ingredients, such as sodium caseinates (Na-CN), whey protein isolate (WPI), egg white proteins (EWP) and soy protein isolate (SPI). In addition, molecular mass distribution, solubility in water, surface hydrophobicity, surface tension and interfacial tension of the meat proteins from BLPC was measured and compared to those of commercial ingredients to gain a better understanding of their interfacial properties.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

Beef lungs were collected by ADIV (Clermont-Ferrand, France). They were crushed in a Stephan grinder (Sympak Group, Germany) for 3 min at 3000 rpm, vacuum-packaged in plastic bags at a gauge pressure of −900 mbar and frozen at −20 °C until used. Approximate composition was determined using AFNOR (French Standards Organisation) procedures for dry matter (NF V04-401 standard), meat proteins (NF V4-407 standard), collagen (NF V04-415 stan-

dard) and fat (NF V04-403 standard). Details on the origin of the commercial proteins used in this study as references for comparison with beef lungs proteins are described in a previous work (Selmane et al., 2008). WPI (88% w/w proteins, enriched in β -lactoglobulin) and EWP (82% w/w proteins) selected in this work were commercial ingredients recommended for use as foaming agents for dairy and bakery/pastry, respectively. Na-CN (87% w/w proteins) was suggested by suppliers as an emulsifying agent for pork-butcher and salted meat products. The same is true of SPI (86% w/w proteins), although the use of soy proteins is usually limited to concentrated emulsions.

2.2. Protein extraction

In the literature, protein solubilisation has been reported to be maximized under alkaline conditions for beef lungs, while protein isolation could be achieved by acid precipitation (see, e.g., Jelen et al., 1979; Selmane et al., 2008; Swingle & Lawrie, 1979). In this work, proteins from beef lungs were extracted using alkaline solubilisation at pH about 9. Extraction was carried out on beef lungs after thawing using a Stephan mixer UMC5 (Sympak Group, Germany) at 1100 rpm. For each run, a 2 l suspension containing 20% (w/v) beef lungs was homogenised for 5 min. The pH was adjusted using a 5 M NaOH aqueous solution. Protein extraction was studied at 20 °C and 30 °C for 60 and 120 min. The suspensions were then centrifuged at 10,000g for 15 min and the supernatants were stored at 4 °C for subsequent analyses.

Concentration was carried out using a method adapted from Selmane et al. (2008) for MDCM. Proteins were concentrated by acid precipitation at pH about 4, typically between 4.0 and 4.5, taking into account that the homogeneity of pH is not easy to achieve in a 2 l concentrated suspension (20% w/v), especially when the objective is a scale-up to industrial equipment. A 37% HCl solution was used to adjust the pH. This step was followed by centrifugation at 10,000g for 20 min. Proteins obtained after precipitation in the form of a paste were frozen at −80 °C and freeze-dried using a commercial freeze dryer (Heto Power Dry PL6000-90, Thermo Electron, France). The recovery yield of proteins was calculated by dividing the weight of proteins recovered in the final powder by the weight of recoverable proteins in the raw materials. The protein contents of both the raw materials and the final powder were estimated from total nitrogen measurements based on the Kjeldhal method (NF V4-407 standard); protein content was deduced by multiplying nitrogen concentration by 6.25.

2.3. Protein solubility

Protein solubility in water was determined by the method of Beuchat (1977). For each run, 2 g BLPC was diluted in 100 ml distilled water; the pH of the solutions was adjusted between 3 and 9 using either a 37% HCl or a 5 M NaOH aqueous solution. These solutions were maintained at 20 °C for 45 min under mechanical agitation and then centrifuged at 9750g for 10 min. The nitrogen content in the supernatants was measured using the Hach procedure (Hach DR890, Germany). This has the advantages of being faster than the conventional Kjeldahl method and to enable up to 24 measurements simultaneously. Its only disadvantage is that it applies only to liquid samples. The procedure consists of converting all nitrogen species into nitrate ions by an addition of persulfate anions in an alkaline medium; then, nitrate ions react with chromotropic acid in acidic conditions and form a yellow complex with a maximum absorbance near to 420 nm, the amount of which can be measured by colorimetry. The influence of protein concentration was investigated by varying the protein content between 1% and 6% (w/v) at constant pH equal to 7. Relative solubility was defined as the ratio of soluble to total nitrogen and expressed as

a percentage. Absolute solubility was calculated using the nitrogen content in the supernatant multiplied by 6.25 and expressed in g/l. Measurements were done in triplicate for statistical purpose.

2.4. SDS-PAGE

The molecular mass distribution of proteins in BLPC was established using sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The method consisted of preparing a 1% (w/v) protein solution buffered at pH 7. This solution was used directly to investigate the total protein content or filtered at 0.45 µm to study only the soluble protein fraction. In both cases, 20 µl of the initial solution or of the permeate were diluted in 80 µl of 0.01 M sodium phosphate buffer at pH 8.3. Then, 25 µl of a treatment solution containing sodium dodecylsulphate, β-mercaptoethanol, glycerol and bromophenol were added to each sample. These were heated at 95 °C for 5 min before cooling. Proteins of molecular mass between 10 and 250 kDa were used as molecular mass markers. 12% polyacrylamide gels were loaded with 20 µl of each marker and the treated samples. Electrophoresis was conducted for 2 h with a power supply of 200 V at 4 °C. Staining and destaining were accomplished using Coomassie Brilliant Blue G and a solution containing 10% acetic acid and 30% methanol, respectively. Gels were then scanned and molecular mass of each subunit was determined from the markers using the software package Quantity One (Bio-Rad, USA). As a rule of thumb, migration distance correlates semi-empirically with $\log [M_w]$ where M_w is the molecular mass of proteins (Weber & Osborn, 1969).

2.5. Size exclusion chromatography

The molecular mass distribution of the soluble fraction of BLPC was also determined by size exclusion chromatography (SEC). Measurements were performed using a Superdex 200 10/300 GL gel filtration column on an Akta FPLC system (Amersham Biosciences, UK). Proteins were eluted with a solvent containing a phosphate buffer to maintain the pH at 7 and 150 mM sodium chloride to adjust the ionic strength. The eluent flow rate was fixed at 0.75 ml/min. A mixture of thymoglobulin (670 kDa), gammaglobulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B12 (1.35 kDa) was used as a standard for calibration. Eluted proteins were detected simultaneously with respect to their refractive index and their absorbance at 280 nm. A calibration curve was obtained by plotting the solvent volume required to elute proteins as a function of the logarithm of molecular mass of standard proteins. For meat proteins, a solution of 2 mg BLPC in 100 µl of distilled water was prepared and filtered using a 0.45 µm membrane before injection in the column. The molecular mass of each fraction of protein concentrates was determined by combining the elution volume of each peak of the chromatogram and the calibration curve.

2.6. Surface hydrophobicity

Extrinsic fluorescence measurements were used to determine the surface hydrophobicity of proteins using the method of Kato and Nakai (1980) with 8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid (ANS) as a fluorescence probe. An aqueous solution with 0.08% (w/v) BLPC was prepared and then subjected to several dilutions with a 20 mM phosphate buffer (pH 7) in order to obtain different protein concentrations. For the determination of the linear domain of fluorescence, care was taken to ensure that the absorbance of the diluted solutions remained between 0.05 and 0.2 at 390 nm. An amount of 15 µl of ANS (8 mM) was added to 1 ml of each diluted sample. The relative fluorescence intensity was measured at 470 nm after excitation at 390 nm using a spectrofluorimeter Flx (Safas, Monaco) with a right angle detection geometry. Excitation

and emission slit-widths were both set at 5 nm. Surface hydrophobicity was calculated by plotting the relative fluorescence intensity vs. protein concentration (Stern–Volmer plot). This parameter corresponded to the initial slope of the curve that was estimated by linear regression analysis. Measurements were done in triplicate for statistical purpose. The same procedure was used to measure the surface hydrophobicity of commercial ingredients, viz. Na-CN, WPI, EWP and SPI.

2.7. Emulsifying and foaming properties

Emulsifying activity index (EAI) was measured using a method from Pearce and Kinsella (1978), as in Selmane et al. (2008). Emulsions with standardised quantities of BLPC or commercial ingredients and of oil phase were prepared using a rotor-stator T25 disperser (Ultra-Turrax, Ika-Werke GmbH, Germany). The emulsifying activity index was determined from the turbidity of the emulsions, estimated by measuring the absorbance at 500 nm using a Mc2 UV-vis spectrophotometer (Safas, Monaco). EAI was deduced from the following equation:

$$EAI = [m^2 \cdot g^{-1}] = \left(\frac{2.303 \cdot A_0}{L} \right) \cdot \frac{2 \cdot d}{10^6 \cdot C \phi} \quad (1)$$

in which A_0 is the absorbance measured just after emulsion preparation, L is the absorption path length ($L = 10^{-2}$ m), C the protein content in water before dilution ($C = 10^{-3}$ g/ml), ϕ the oil volume fraction in the emulsion ($\phi = 0.25$) and d the dilution factor ($d = 100$).

The emulsion stability index (ESI) was determined by measuring the absorbance of the emulsion after 10 min (Pearce & Kinsella, 1978). ESI is expressed in minutes and is calculated by the following equation:

$$ESI[\text{min}] = 10 \cdot \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (2)$$

in which A_{10} is the absorbance measured after 10 min.

Emulsion capacity (EC) was measured using a classical conductivity method (Hill, 1996) applied for example in Thakur, Villette, Aubry, and Delaplace (2008). Sunflower oil was added continuously to an aqueous phase with 2% (w/v) proteins and 1% (w/v) sodium chloride at pH 7. Conductivity was recorded using a CDM210 conductimeter (Radiometer Analytical, France) and plotted as a function of the oil volume fraction ϕ . EC was defined as the oil volume that could be emulsified per g proteins. It was deduced from the ϕ value for which conductivity exhibits a sharp decrease in the conductivity vs. ϕ plot.

The foaming ability was measured as described in Selmane et al. (2008), using a method from Coffman and Garcia (1977). Standardised solutions of 2% (w/v) BLPC or commercial protein ingredients were placed in test tubes, and then mechanically stirred using a rotor-stator device (T25, Ultra-Turrax, Germany) for 2 min. Foaming ability was estimated using the FA parameter. This was expressed as a percentage and defined as follows:

$$FA[\%] = 100 \cdot \frac{V_f - V_i}{V_i} \quad (3)$$

In Eq. (3), V_i is the initial and V_f the final volume after foaming. Foaming stability was measured using the FS parameter that corresponded to the time necessary for halving the volume of foam formed immediately after whipping. FS is expressed in minutes.

2.8. Surface and interfacial tensions

Interfacial and surface tensions of BLPC were compared to those of commercial proteins using a K12 tensiometer (Krüss GmbH,

Germany) equipped with a Wilhelmy plate. Aqueous solutions of 0.1% (w/v) BLPC or commercial proteins were prepared. For interfacial tension measurements, sunflower oil was used as the organic phase. The evolution of interfacial tension of all the protein samples presented a dynamic behaviour. The values decreased slowly, but continuously over time. For comparison purpose, the values after 10 min measurement were retained, as they corresponded to the time used to estimate ESI in Section 2.7. Similarly, for surface tension measurements, equilibrium could not be achieved rapidly. The surface tension curve exhibited a slow decrease as a function of time. In this work, the values measured after 180 s have been reported for comparison. Measurements were done in triplicate for statistical purpose.

3. Results and discussion

3.1. Protein extraction and purification

Results from the effect of operating time and temperature on extraction yield at pH 9 showed that the extraction yield increased with extraction time and operation temperature. This is in accordance with data of Swinger and Lawrie (1979). However, the increase of protein recovery due to extraction time was slight, from 68% to 70% and from 72% to 76% when temperature was 20 and 30 °C, respectively; consequently, the increase resulting from temperature was also limited +4% and +6% for extraction time of 60 min and 120 min, respectively. The key point is that these differences nearly vanished after purification by pl precipitation. As a result, an increase of extraction time or temperature is not justified for an industrial application. Further experiments have therefore been conducted at 20 °C and for 60 min for protein extraction.

The overall yield of proteins in BLPC was 40%. The composition of the powder (BLPC) obtained after purification/concentration by acid precipitation and freeze-drying is reported in Table 1 and compared to the composition of raw materials. The protein content in BLPC was 76% (w/w), which is typical for protein concentrates, but with a high lipid residue 15% (w/w). The increase of the protein-to-dry-matter mass ratio in comparison to the raw materials resulted mainly from the removal of collagen, as the protein-to-fat mass ratio was not significantly different between raw materials and BLPC (Table 1). A comparison with the results of Selmane et al. (2008) showed that protein recovery after concentration by pl precipitation was similar to the value obtained after microfiltration/ultrafiltration. Additionally, the protein-to-dry-matter mass ratio did not differ significantly between both types of meat protein concentrates (Table 1).

As a conclusion, acid precipitation at pH 4 seems to be able to provide meat protein concentrates with the same composition as membrane techniques and with a similar protein recovery yield after extraction from beef lungs. From a technico-economical point of view, acid precipitation is a less expensive technology because it requires lower investments in equipment and also because the operating costs are lower. However, it is now necessary to ascer-

tain that BLPC obtained in this work present the same technofunctional properties as in Selmane et al. (2008).

3.2. Protein solubility

Experimental data on solubility is of utmost importance for the determination of the optimum conditions of extraction and purification of meat proteins, but it is also of primary significance for the practical applications of BLPC in the food industry. As a result, this parameter is often the first functional property measured during the preparation, the transformation and the use of proteins as ingredients in the food industry (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1985). The relative solubility of BLPC as a function of pH, i.e. freeze-dried concentrates recovered after alkaline extraction and acid precipitation, is illustrated by Fig. 1a. The evolution of the relative solubility of a protein as a function of pH presents usually a V or a U shape. The minimum value corresponds to the pl of protein (Cheftel et al., 1985). This also applies to BLPC. However, as the extracts are complex mixtures of meat proteins, the low solubility region was larger, between pH 4 and pH 6. Similarly, the ratio between the minimum solubility and the solubility at pH 7 was about 0.5 for the same reason. Finally, the relative solubility at pH 7 is remarkably high if one considers that a fraction of the proteins cannot be separated from the emulsified fat particles.

The influence of BLPC concentration on solubility is shown in Fig. 1b. The relative protein solubility remained constant at 70% when BLPC concentration was increased in the range studied at

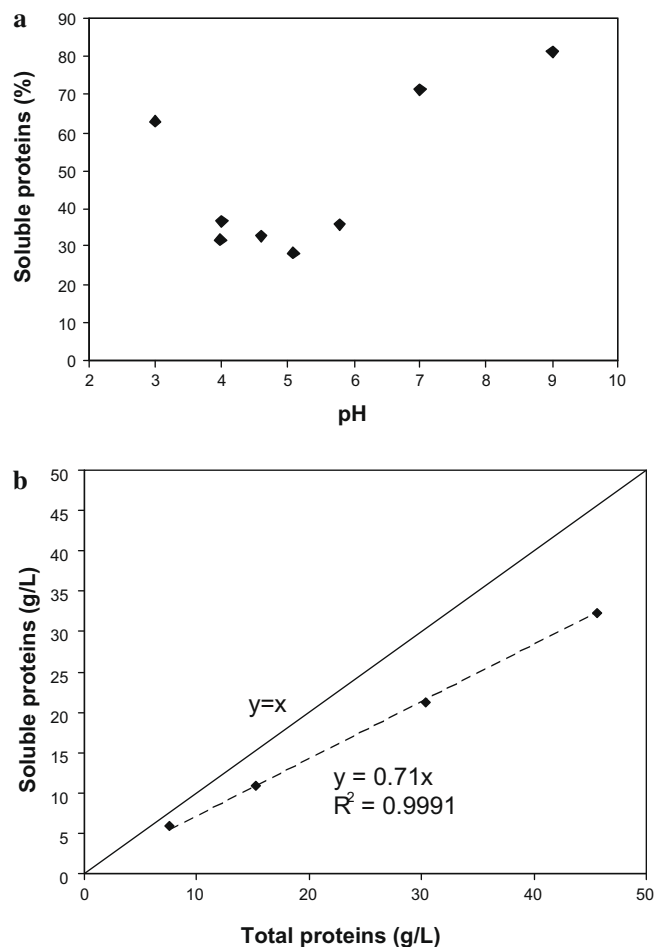


Fig. 1. (a) Effect of pH on protein solubility for a 20 g/l BLPC solution; (b) Effect of BLPC concentration on protein solubility at pH 7.

Table 1

Composition of raw materials, freeze-dried extracts before pl precipitation and BLPC obtained from beef lungs after pl precipitation and freeze-drying.

Composition	Raw material	Extract (freeze-drying)	BLPC
Free lipids % (w/w)	2.9 ± 0.2 ^a	16 ± 1	15 ± 2
Recoverable proteins % (w/w)	13.8 ± 0.3	67 ± 2	76 ± 2
Collagen % (w/w)	4.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Water % (w/w)	78.5 ± 0.5	8.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Protein/dry matter ratio	64.2 ± 0.5	73 ± 2	78 ± 2
Protein/fat ratio	4.8 ± 0.2	4.2 ± 0.6	5.0 ± 0.8

^a Mean ± SD on three runs.

pH 7. However, the absolute solubility increased linearly with protein concentration, which denotes the presence of an insoluble protein fraction that may be formed by large protein aggregates or by proteins that emulsify the lipids. Protein solubility values higher than 2% (w/v), the typical value of Na-CN content as an emulsifier in manufactured meat products, were therefore achieved. As a conclusion, BLPC exhibits a good relative solubility, maybe slightly lower than those of commercial protein isolates that are often higher than 80% and even 90%, especially for milk proteins (Wohlt, Sniffen, & Hoover, 1972). The absolute solubility of BLPC is however remarkably high in view of the fact that it contains only meat proteins extracted from beef lungs and also 15% fat.

3.3. SDS-PAGE and SEC

In the electrophoretogram of BLPC (Fig. 2), the band intensities show that 17% of the proteins exhibited a molecular mass below 20 kDa, 31% were about 25–30 kDa, 25% around 40 kDa, 13% about 55 kDa and 14% between 70 and 75 kDa. When filtration at 0.45 μ m was applied for comparative purposes with SEC measurements, only the two smallest fractions were detected. The ratio of their relative band intensities was similar to that measured in non filtered samples. This shows that fractions with higher molecular mass were mainly present in forms of aggregates or corresponded to subunits of larger proteins denatured by SDS-PAGE.

The SEC chromatogram of filtered BLPC solutions is presented in Fig. 3a. This method gives complementary information to the SDS-PAGE, but only on the soluble protein fraction, as filtration is compulsory before SEC measurements. No differences were found between filtration at 0.45 μ m (Fig. 3a) and 0.22 μ m (data not shown). It can be seen from Fig. 3a that soluble beef lungs proteins consist of several fractions, but it must also be remembered that only the proteins eluted between 10 and 20 ml correspond to the range of molecular mass of the calibration curve. Higher eluted volumes are representative of impurities, such as small molecular and ionic compounds (lower than 1 kDa), whereas lower ones may correspond essentially to protein aggregates. The average molecular mass of the peaks corresponding to each fraction in the chromatogram of extracted proteins was determined and is summarised in Table 2. This shows that beef lung proteins exhibit molecular mass between 3 and 500 kDa. However, it must be mentioned that only the UV absorbance chromatogram is reported in Fig. 3a and that the relative size of the peaks cannot be related to the relative amount of proteins in each fraction. The main protein fractions detected by SDS-PAGE can however be found by SEC: the peaks of average M_w equal to 13 kDa, 36 kDa and 77 kDa correspond

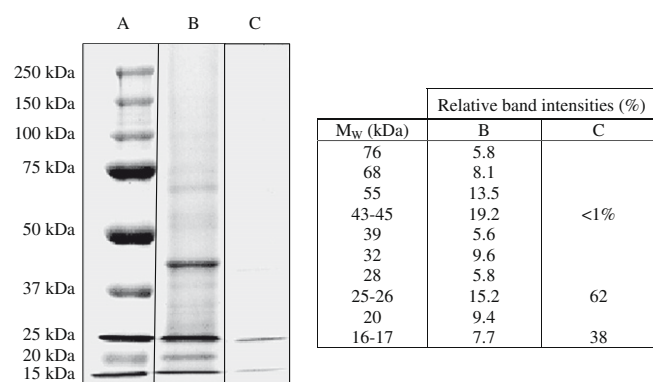


Fig. 2. SDS-PAGE profiles: (A) standards; (B) BLPC; (C) soluble fraction of BLPC recovered after a 0.45 μ m filtration for comparison with SEC.

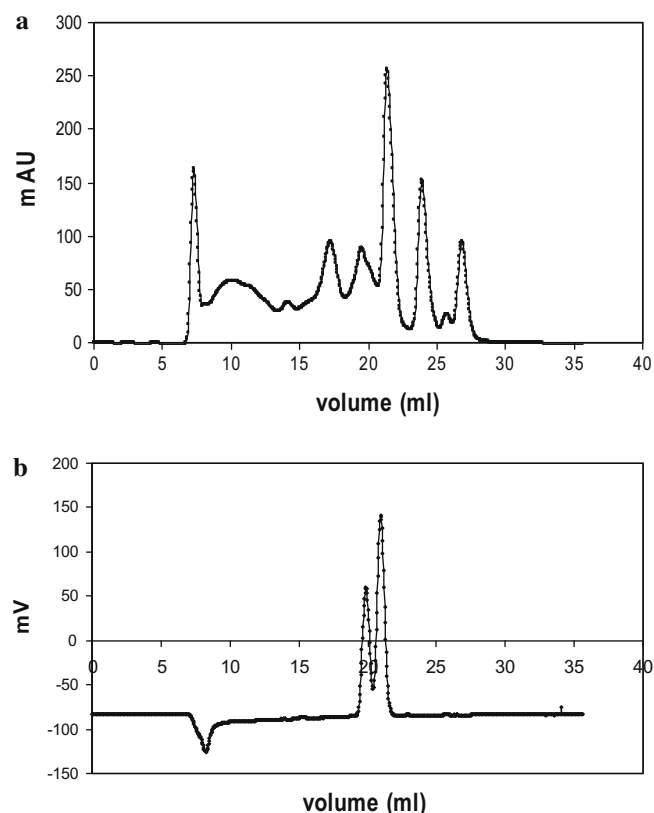


Fig. 3. Elution patterns of beef lungs proteins filtered at 0.45 μ m using SEC: (a) absorbance signal monitored at 280 nm (b) refractive index detector signal.

Table 2

Average molecular mass of the main proteins of the soluble protein fraction of BLPC derived from SEC measurements.

Eluted volume (ml)	Molecular mass (kDa)
10.3	500
11.7	280
12.6	190
14.3	77
15.7	36
17.4	13
19.6	3

roughly to the main bands in Fig. 2. Only the fraction corresponding to 55 kDa in SDS-PAGE could not be detected in SEC. This may be attributed to the possible low UV absorbance of the proteins exhibiting this molecular mass, but also to the fact that these proteins consist essentially of subunits of larger protein structures, such as polymers or aggregates that appear clearly in Fig. 3a for eluted volumes lower than 13 ml. Surprisingly, the refractive index data, that is more quantitative than UV absorbance, show that the characteristic peak of low-molecular-mass proteins, about 3–5 kDa, could represent an important mass fraction of the soluble proteins (Fig. 3b). This can be attributed to the presence of peptides or small proteins. Their amount can be partly explained by the strong mechanical treatments such as crushing, thermal treatments (freezing) and subsequent chemical treatments that have been applied to beef lungs, but also by the high solubility of these small molecules in comparison to larger proteins during extraction and purification steps. Additionally, mammalian lungs are also known to contain small surfactant-associated proteins, between 5 and 18 kDa, that are highly hydrophobic and play a key role on alveolar stability (Galdston, Shah, & Shinowara, 1969; Warr et al.,

1987). As a result, one can conclude that proteins in BLPC exhibit a large spectrum of molecular mass with insoluble and soluble aggregates on one hand, but also low-molecular mass compounds on the other hand. This particular composition may play a key role on their technofunctional properties. For example, aggregated and polymerised proteins are known to affect widely the formation and the stabilisation of WPI foams (Davis & Foegeding, 2004).

3.4. Surface hydrophobicity

The evolution of the relative fluorescence intensity of BLPC is nearly linear as a function of protein concentration and the slope corresponds to the surface hydrophobicity of BLPC. This value has been compared to those of commercial ingredients in Table 3. From this table, it appears that the hydrophobicity of BLPC was higher than that of the others sources of proteins, except for SPI that is known to be a good emulsifier, especially for highly concentrated emulsions. Thus, the meat protein concentrate should be a good emulsifying agent. Indeed, according to Dickinson (1992), a good emulsifying agent should exhibit a remarkable level of hydrophobicity. In particular, surface hydrophobicity is high if one accounts for the high solubility of BLPC, as hydrophobicity and solubility have often been reported to be negatively correlated (Li-Chan, Nakai, & Wood, 1984). Conversely, the correlation between surface hydrophobicity and foaming properties has often been shown to be weaker (Dickinson, 1992). This may be due to the fact that hydrophobic regions of proteins are able to penetrate into an oil phase, whereas this trend is limited when oil is replaced by air (Bos & van Vliet, 2001). More generally, the relationship between surface hydrophobicity and the ability of proteins to form and stabilise an emulsion is not straightforward and has been widely discussed by many authors. It depends particularly on the method used for the measurement of surface hydrophobicity (Nakai, 2003) and on protein solubility (Li-Chan et al., 1984; Molina, Papadopoulou, & Ledward, 2001). Additionally, the presence of lipids in BLPC interferes with the measurement of surface hydrophobicity (Nakai, 2003), but it constitutes also a supplementary proof that proteins in BLPC show a high affinity with lipids. The high hydrophobicity and the high lipid content of BLPC may also be partly related to the presence of pulmonary surfactant-proteins. These are known to be highly hydrophobic phospholipid-rich lipoproteins (Galdston et al., 1969) for which the separation between the surfactant lipid and the protein is difficult by conventional lipid extraction procedures (Arjomaa & Hallman, 1988). Actually, lipid removal from BLPC has been shown to be accompanied by a reduction of protein hydrophobicity, which is in agreement not only with the previous statement, but also with literature data (Arêas et al., 1993).

3.5. Interfacial and surface tension

Figs. 4 and 5 display the respective evolutions of interfacial and surface tensions vs. time. Table 3 summarises the recorded values

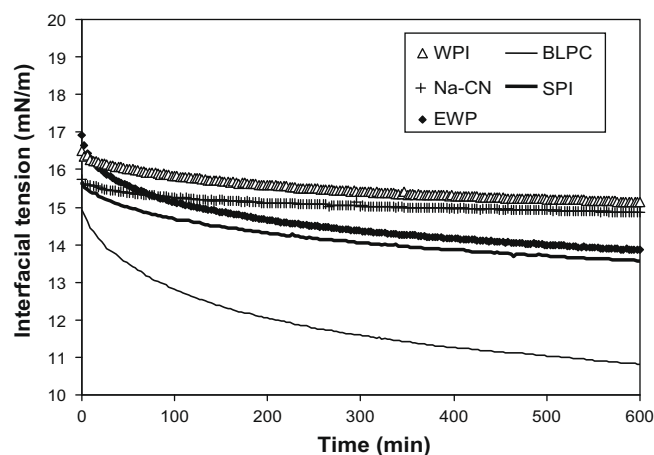


Fig. 4. Comparative evolution of interfacial tension vs. time for 0.1% (w/v) BLPC, EWP, SPI and Na-CN solutions.

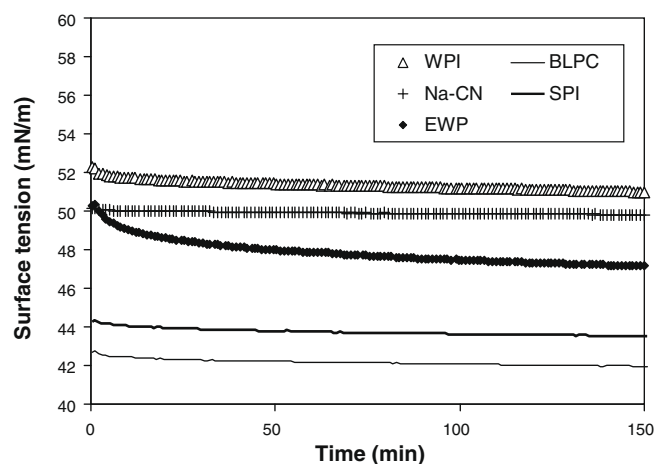


Fig. 5. Comparative evolution of surface tension vs. time for 0.1% (w/v) BLPC, EWP, SPI and Na-CN solutions.

for comparison purpose. This table and the corresponding figures demonstrate clearly that BLPC exhibited the lowest interfacial tension, far lower than other proteins, which was in agreement with its high surface hydrophobicity. BLPC not only presented immediately a lower interfacial tension, but Fig. 4 demonstrates that the gap between the respective curves of BLPC and other commercial ingredient increased also with time. Figs. 4 and 5 show also that interfacial and surface tensions exhibited qualitatively the same trends, with BLPC < SPI < EWP < Na-CN < WPI. These trends may be explained by the high amount of proteins exhibiting a low

Table 3

Comparison of surface hydrophobicity (ANS probe), interfacial tension, surface tension, emulsifying activity (EAI), emulsion stability (ESI), emulsion capacity (EC), foaming ability (FA) and foaming stability (FS) of BLPC and commercial proteins.

Protein types	BLPC (pl precipitation)	EWP	Na-CN	SPI	WPI	BLPC ^b (membrane)
Hydrophobicity	205 ± 9 ^a	66 ± 4	165 ± 10	334 ± 2	72 ± 6	–
Interfacial tension (mN/m) after 10 min	10.8 ± 0.4	14 ± 1	15 ± 1	12.3 ± 0.6	15 ± 2	–
Surface tension (mN/m) after 180 s	42 ± 1	47 ± 0.5	49.8 ± 0.5	43.7 ± 0.5	51 ± 0.5	–
EAI (m ² g ⁻¹)	90 ± 20	51 ± 6	56 ± 4	48 ± 8	42 ± 2	90 ± 10
ESI (min)	17 ± 2	18 ± 3	15 ± 2	17 ± 2	33 ± 2	17 ± 2
EC (ml/g)	320 ± 20	263 ± 10	400 ± 12	362 ± 7	306 ± 5	–
FA (%)	46 ± 3	42 ± 3	45 ± 3	18 ± 3	74 ± 2	47 ± 3
FS (min)	80 ± 2	237 ± 4	19 ± 4	60 ± 2	61 ± 3	60 ± 4

^a Mean ± SD on three runs.

^b Data from Selmane et al. (2008).

molecular mass in BLPC: these can diffuse and rapidly stabilise the interfaces. The dynamic decrease of interfacial tension also shows that the interfacial film was gradually reinforced by fractions of higher molecular weights that diffused more slowly, but contributed to a further decrease of interfacial tension and could better stabilise the interfaces. Indeed, the presence of larger protein structures, such as aggregates, is known to enhance the viscoelasticity and the stability of interfacial films, as reported by Davis and Foegeding (2004) for polymerised WPI. As a result, the high interfacial properties of BLPC seem to result mainly from its large spectrum of molecular mass, together with the high hydrophobicity and affinity with lipids of some of its protein fractions, such as pulmonary surfactant-proteins (Camacho, Cruz, Castro, Casals, & Perez-Gil, 1996; Taneva, Stewart, Taylor, & Keough, 1998). As already mentioned for surface hydrophobicity, the relationship between the emulsifying properties of proteins and interfacial tension is however not straightforward. Similar conclusions have been drawn between foaming properties and surface tension in the literature (Kitabatake & Doi, 1982). These quantities give however an indication on the interfacial properties of proteins.

3.6. Emulsifying properties

The emulsifying activity (EAI), stability (ESI) and capacity (EC) of BLPC from pl precipitation are summarised in Table 3 and compared to those of commercial ingredients and to those of Selmane et al. (2008) on BLPC purified by membrane techniques. Proteins from beef lungs exhibited the highest emulsifying activity. This is a remarkable result for two main reasons. Firstly, BLPC was compared with protein isolates of higher purity, and secondly, BLPC contained about 15% (w/w) lipids. These results are however not contradictory and confirm a high affinity between proteins from BLPC and lipids. They indicate that these lipids are probably associated with proteins in hydrophobic lipoproteins; these favour simultaneously emulsion formation and stabilisation, contrary to the competitive adsorption behaviour that is commonly observed in food products between proteins and surfactants (Bos & van Vliet, 2001). The ESI value of BLPC remained similar to those of commercial proteins known as emulsifiers, especially Na–CN. The fact that ESI is maximum for WPI in Table 3 does not mean that it is a good emulsifying agent, as WPI displayed the lowest EAI value. This stems only from the fact that coalescence is more likely to occur rapidly when EAI is high because of higher interfacial area and higher droplet number in BLPC emulsions than in WPI emulsions. Similar trends had already been described by Dickinson and Stainsby (1982). Experimental results confirm therefore that BLPC is of high interest for emulsion preparation, especially for elaborated meat products. EAI and ESI are also statistically similar to those reported by Selmane et al. (2008) when membrane techniques were applied for purification and concentration (Table 3).

Emulsion capacity is another key parameter of emulsion processing. It was measured for BLPC and compared to the values of commercial ingredients. It must be mentioned that EC values can only be used for comparison because they may depend on the equipment utilised in emulsion formation. However, EC data confirms that Na–CN and SPI presented the highest emulsifying capacity and that BLPC displayed an intermediate behaviour, better than EWP and WPI. The performance of BLPC is remarkable if one considers again that such a product consists only of a protein concentrate compared to purified protein isolates. The EC value, 320 ml/g proteins, is also far higher than typical oil/protein mass ratios used in the food industry. As a result, EAI, ESI and EC confirm the applicability of BLPC as an emulsifying agent. Conversely, there is no statistical correlation between solubility, interfacial and surface tensions, surface hydrophobicity, EAI, ESI and EC for the five types of protein ingredients compared in this work. A similar situation

has already been reported in the literature (Molina et al., 2001). In general, it seems that the high solubility in water, together with the high EAI values of BLPC and the rapid decrease of interfacial tension can be attributed to the presence of low-molecular-mass compounds observed by SEC in Fig. 3 that are not present in all the other commercial ingredients. Another possible explanation lies in the high affinity of some proteins of BLPC with lipids that may explain its high hydrophobicity. This affinity may however become a problem from a technico-economical point of view if defatting is required (Arjomaa & Hallman, 1988), as for mechanically deboned chicken meat (Selmane et al., 2008) because this will decrease the protein recovery and also impair the technofunctional properties (Bastos & Arêas, 1990).

3.7. Foaming properties

The foaming ability (FA) and foaming stability (FS) of BLPC and commercial ingredients are reported in Table 3. The results are also close to those described by Selmane et al. (2008), which confirms that pl precipitation and membrane processes lead to protein concentrates with similar technofunctional properties. This table shows also that the foaming ability FA of BLPC is statistically similar to those of Na–CN and EWP, far higher than that of SPI, but lower than that of WPI. Conversely, foam stability FS is higher than that of all the ingredients, except EWP, which provided highly stable foams, as expected. As a result, BLPC appeared to be a good foaming agent. The difference between foaming and emulsifying properties in Section 3.6 may be related to the high affinity between lipids and BLPC that is reduced when oil is replaced by air.

However, foaming is a technofunctional property of proteins that plays an ambiguous role. Even though foamed foods are of high interest for food processors (Campbell & Mougeot, 1999), the amount of meat proteins used in foamed food is reduced in meat products in comparison, for example, to the use of milk proteins in dairy foams. In manufactured meat products, the objective is often to avoid foam formation during emulsification. As a conclusion, EAI, ESI, EC, FA and FS values show that BLPC undoubtedly presents the properties of an emulsifying agent that could advantageously replace Na–CN and even SPI in highly concentrated emulsions of elaborated meat products, but at the expense of a higher tendency to form foams when subjected to high shear conditions.

4. Conclusions

This study has investigated the extraction of proteins from a slaughterhouse by-product, beef lungs, by alkaline solubilisation and acid precipitation method at pilot scale. The overall extraction yield was 40%; this value was similar to that obtained in a previous work using membrane processes based on microfiltration and ultrafiltration (Selmane et al., 2008), but also to literature data on laboratory-scale experiments.

Solubility, SDS–PAGE and SEC measurements of BLPC obtained after freeze-drying have highlighted the simultaneous presence of an abundant low-molecular-mass fraction and of large protein structures that include both soluble and insoluble protein aggregates, as BLPC solubility was about 70% at pH 7. Proteins from BLPC were also shown to exhibit a higher surface hydrophobicity, a lower surface tension and a lower interfacial tension than those from most commercial protein ingredients studied in this work. Experimental results demonstrated that BLPC displayed good emulsifying properties, with a particularly high emulsifying activity: BLPC can therefore be as emulsifiers used in elaborated meat products in place of the commonly used sodium caseinates. BLPC exhibited also good foaming properties, but lower than emulsifying properties,

which may sometimes be an advantage from an industrial point of view.

Finally, a last key point is that the properties of BLPC from acid precipitation in this work are similar to those measured in Selmane et al. (2008) on BLPC obtained using membrane techniques, even though this work used a simpler and less expensive process. The results suggest therefore that pl precipitation constitutes a suitable tool for purification of BLPC at industrial scale, although further work is still needed to confirm that the emulsifying properties of BLPC will be unaltered by interactions with other ingredients and additives in elaborated food products.

Acknowledgements

The authors acknowledge ADIV (Association de Développement de l'Institut de la Viande) for its support.

References

- Areãs, J. A. G. (1985). Lipid–protein interactions in offal protein isolates: Effects of several solvents on lipid extraction. *Journal of Food Science*, 50, 1382–1398.
- Arêas, J. A. G., Alcocer, M. J. C., & Mota, E. M. A. (1993). Effect of organic solvent and the lipid content on functionality of bovine lung protein isolates. *Food Chemistry*, 48, 285–290.
- Arjomaa, P., & Hallman, M. (1988). Purification of a hydrophobic surfactant peptide using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 171, 207–212.
- Bastos, D. H. M., & Arêas, J. A. G. (1990). Lung proteins: Effect of defatting with several solvents and extrusion cooking on some functional properties. *Meat Science*, 28, 223–235.
- Beuchat, L. R. (1977). Fonctionnal and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 258–261.
- Boles, J. A., Rathgeber, B. M., & Shand, P. J. (2000). Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. *Meat Science*, 55, 223–231.
- Bos, M. A., & van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91, 437–471.
- Camacho, L., Cruz, A., Castro, R., Casals, C., & Perez-Gil, J. (1996). Effect of pH on the interfacial adsorption activity of pulmonary surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5, 271–277.
- Campbell, G. M., & Mougeot, E. (1999). Characterization. Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 283–296.
- Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., & Lorient, D. (1985). *Protéines alimentaires: Biochimie-Propriétés fonctionnelles-Valeur nutritionnelle-Modifications chimique*. Paris, France: TEC & DOC.
- Coffman, C. W., & Garcia, W. W. (1977). Functional properties amino acid composition protein isolate from mug bean flour. *Journal of Food Technology*, 12, 473–484.
- Davis, J. P., & Foegeding, E. A. (2004). Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 69, C404–C410.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to food colloids*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1982). *Colloids in foods*. London, UK: Applied Science Publishers.
- Fonkwe, L. G., & Singh, R. K. (1996). Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 31, 605–616.
- Galdston, M., Shah, D. O., & Shinowara, G. Y. (1969). Isolation and characterization of lung lipoprotein surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 29, 319–334.
- Gómez-Juárez, C., Castellanos, R., Ponce-Noyola, T., Calderón, V., & Figueroa, J. (1999). Protein recovery from slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*, 70, 129–133.
- Hill, S. E. (1996). Emulsions. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (pp. 153–185). London: Blackie Academic and Professional.
- Jelen, P., Earle, M., & Edwardson, W. (1979). Recovery of meat protein from alkaline extracts of beef bones. *Journal of Food Science*, 44, 327–331.
- Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 13–20.
- Kitabatake, N., & Doi, E. (1982). Surface tension and foaming of protein solutions. *Journal of Food Science*, 47, 1218–1221.
- Ledward, D. A., & Lawrie, R. A. (1984). Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34B, 223–228.
- Li-Chan, E., Nakai, S., & Wood, D. F. (1984). Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *Journal of Food Science*, 49, 345–350.
- Liu, D. C. (2002). Better utilization of by-products from the meat industry. <<http://www.agnet.org/library/eb/515/>>.
- Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15, 263–269.
- Nakai, S. (2003). Measurement of protein hydrophobicity. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, B5.2, 1–13.
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins. Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716–723.
- Selmane, D., Vial, C., & Djelveh, G. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79, 640–647.
- Swingler, G. R., & Lawrie, R. A. (1979). Improved protein recovery from some meat industry by-products. *Meat Science*, 3, 63–73.
- Taneva, S. G., Stewart, J., Taylor, L., & Keough, K. M. W. (1998). Method of purification affects some interfacial properties of pulmonary surfactant proteins B and C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1370, 138–150.
- Thakur, R. K., Villette, C., Aubry, J. M., & Delaplace, G. (2008). Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315, 285–293.
- Warr, R. G., Hagwood, S., Buckley, D. I., Crisp, T. M., Schilling, J., Benson, B. J., et al. (1987). Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): Isolation, characterization and cDNA and amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 84, 7915–7919.
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 4406–4412.
- Wohlt, J. E., Sniffen, C. J., & Hoover, W. H. (1972). Measurement of protein solubility in common feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, 56, 1052–1057.

Emulsification properties of proteins extracted from beef lungs in the presence of xanthan gum using a continuous rotor/stator system

SELMANE Darine^{*}, VIAL Christophe, DJELVEH Gholamreza

Clermont Université, ENSCCF, LGCB, 24 av. des Landais, BP 206, 63174 Aubière Cedex, France

Abstract

The emulsifying properties of beef lung protein concentrate (BLPC) in the presence of xanthan gum were investigated under steady state conditions using a continuous rotor/stator device. Experiments were defined using design of experiments methodology which included formulation and process variables. The influences of xanthan and protein contents were studied first on the properties of the continuous phase, namely viscosity and interfacial tension. Then, emulsion properties, such as average droplet diameter, viscosity and stability against creaming were analyzed using a split-plot design. Experimental results showed that rotation speed played the key role on droplet size reduction, whereas emulsion texture depended slightly on process variables and was governed by the recipe, i.e. by protein and xanthan contents. Conversely, emulsion stability resulted simultaneously from formulation and process factors. Finally, a comparison of BLPC with commercial sodium caseinates in similar recipes under identical operating conditions highlighted the high emulsifying properties of these beef lung proteins.

Keywords: continuous emulsion preparation, meat proteins, lung proteins, xanthan-protein interactions, rotor/stator device

^{*} Corresponding author. Tel: + 33(0)479407954; Fax: +33(0)473407829; Email address: darineslmane@yahoo.com.

Introduction

Changes in peoples' food habits, the development of new health concerns about meat and the mad cow disease (bovine spongiform encephalopathy) problem have all contributed to an ever increasing amount of slaughterhouse meat by-products that meat plants have to deal with. The consequences have been not only the loss of a valuable source of potential benefits for the procedures, but also negative environmental effects due to the fact that these by-products have to be incinerated. The majority of these by-products have a high protein content, between 15-20% (w/w), and good nutritional properties as they contain many essential nutrients such as amino acids, hormones, minerals, vitamins and fatty acids (Liu, 2002). This explains why considerable interest has been aroused in the development of techniques for the recovery and utilization of proteins from animal by-products as human food in the recent years (Boles, Rathgeber & Shand, 2000).

In our previous paper (Selmane, Vial & Djelveh, 2008 and 2010), methods for extracting proteins from slaughterhouse by-products, such as mechanically deboned chicken meat (MDCM), pork and beef lungs were described. Extraction was conducted in water under pH, temperature and during time conditions able to maintain the functional properties of the proteins. These functional properties were studied at bench scale and compared with other commercial proteins, such as milk and soy proteins. Experimental results showed that some fractions of the concentrated and purified proteins exhibited excellent functional properties. For example, pork lung and MDCM proteins presented very high gel strengths, higher than beef plasma and egg white proteins, while pork lung proteins displayed a lower gelation temperature (about 45°C), which may be useful in the preparation of cooked meat products. Similarly, as some commercial protein concentrates (for example sodium caseinates, denoted NaCN), pork and beef lung proteins appeared to be good emulsifiers. The physicochemical properties of proteins extracted from beef lungs such as molecular mass, solubility, surface hydrophobicity, surface and interfacial tension were also investigated. It has also been shown that proteins from beef lungs included an abundant low-molecular-weight fraction, together with proteins of high molecular weight, up to about 500 kDa. Experimental data also highlighted that the protein extracts exhibited good solubility at neutral pH and high hydrophobicity, with small surface and interfacial tensions. These results explained the excellent emulsifying properties, similar to NaCN, and the good foaming properties of beef lung proteins.

Accordingly, the beef lung protein concentrate (BLPC) seems to be a good candidate as an emulsifier in meat products in place of milk or soy proteins. However, prior to any industrial application, it is still necessary to establish whether such proteins maintain their functionality in the presence of other ingredients. Indeed, food systems are mainly structured by a complex assembly of various food ingredients, such as proteins, polysaccharides, lipids, sugars, emulsifiers, minerals and water. Among these components, proteins and polysaccharides play a key role in the texture and stability of food emulsions; proteins are generally used to stabilize the oil droplets, while polysaccharides are usually added to increase the viscosity or to obtain a gel-like product. A key problem is that the interactions between polysaccharides and proteins can sometimes lead to thermodynamic incompatibility, resulting in phase separation when proteins and polysaccharides repel each other: the segregation of the biopolymers takes place and two distinct phases can be formed, each of them being enriched with only one biopolymer species (Kooshan, Jianshe & Mousavi, 2007). Besides, complex coacervation can also be observed, especially as a function of pH, when the biopolymers attract each other; this may also lead to phase separation: in this case, one phase contains coacervates, whereas the other one is depleted of polymers.

The aim of this paper is first to study whether BLPCs maintain their functionality to produce a stable emulsion under different operating conditions in the presence of polysaccharides. Among the various polysaccharides used in the food industry, xanthan gum has been chosen in this work. Xanthan is used in meat preparations because it exhibits high solubility over a large pH range when compared with others polysaccharides (guar, CMC, alginates, etc.). The interactions between xanthan and milk proteins have been extensively studied in the literature. It is well known that the interactions between sodium caseinates and xanthan often lead to phase separation, contrarily to gum arabic, carrageenans and some alginates (Syrbe, Bauer & Klostermeyer, 1998; Singh, al., 2003a, 2003b). However, there are only a few publications on the interaction between xanthan gum and meat proteins, the majority of them describing only the effect of xanthan addition directly in meat preparations. For example, Barbut and Mittal (1992) analyzed the effect of xanthan addition (0.5%) to pork sausage and found that xanthan gum improved water and fat holding capacity at the expense of a gummy and chewy texture.

In most food applications, the formation of an emulsion may involve two successive mixing steps, including the preparation of a pre-emulsion from two separate liquids, followed by a homogenization step consisting of the reduction of droplet size of the pre-emulsion (McClements, 1999). As stressed by Dickinson and Stainsby (1982), it is more efficient to prepare an emulsion using two steps. Generally, oil and water phases are converted into a coarse emulsion which contains fairly large droplets using batch mixers (e.g., a high-speed blender), while the second step is more commonly carried out under steady state conditions (e.g., high pressure homogenizers, colloid mills, etc.). The preparation of pre-emulsions may, however, be conducted using a continuous process, which reduces mixing time considerably and also operation costs, but this often requires that a high stability be achieved at shorter mixing times than with batch processes.

In this work, the emulsifying properties of BLPC were investigated using a continuous rotor/stator (RS) system under steady state conditions and a protein-xanthan mixture as the primary phase in order to form oil-in-water emulsions. The experiments were organized on the basis of a split-plot experimental design to study the combined influence of formulation variables (xanthan and BLPC contents) and process parameters (rotation speed and residence time). The performance of this pre-emulsification step was estimated using emulsion properties, such as droplet size, viscosity and stability over time. Finally, the properties of BLPC and NaCN as emulsifying agents in this continuous operation were compared under similar recipes and operating conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Raw materials preparation and characterization

Proteins from beef lungs were obtained by extraction using a method based on alkaline solubilization at pH 9 followed by acid concentration at pH 4 (Selmane et al., 2008). Extraction was carried out on beef lungs in a high speed mixer UMC5 (Sympak Group, Germany) at 1,100 rpm. For each run, 2 L of a suspension containing 20% (w/v) beef lungs were homogenized for 5 min. The pH of the suspension was adjusted using a 5M NaOH aqueous solution. Temperature was maintained at 20°C and operating time at 60 min. The suspensions were then centrifuged at 10,000g for 15 min. Proteins were concentrated by acid precipitation using a 37% HCl aqueous solution at pH 4; then, they were subjected to centrifugation at 10,000g for 20 min. The proteins obtained after precipitation in the form of a paste were frozen at -80°C and freeze-dried using a commercial freeze dryer (Heto Power Dry PL6000-90, ThermoElectron, France). Beef lungs proteins in the form of a powder contained about 76±2% protein, 15±2% lipids, other minor components (<0.5%) and moisture (<2.8%). Xanthan gum was supplied from Danisco (Grinsted® Xanthan 80, Denmark). In all preparations, sodium chloride was added (0.1% w/w) to increase the solubility of the proteins and sodium azide (0.02% w/w) was used for preservation. Commercial sodium caseinates (α-116) used in this work contained 87% protein and were supplied by Soussana (France).

The continuous phase was prepared by dispersing the proteins, sodium chloride and sodium azide together in three quarters of the total volume of distilled water during 3h at room temperature. As BLPC corresponds to the protein fraction of beef lung that is highly soluble above pH 6 at 20°C (Selmane et al., 2010), room temperature was chosen because the solubilisation of beef lung proteins was easy to carry out at pH 7, even though this does not match necessarily the optimum conditions. pH was therefore adjusted to 7 using a 5M NaOH aqueous solution. At the same time, xanthan gum was combined with one quarter of the total volume of distilled water. The two aqueous solutions were then mixed together and stirred gently overnight using a mechanical mixer equipped with a four-paddle impeller (Ika, RE16, Germany). The primary phases containing BLPC and NaCN were prepared using exactly the same procedure. For the oil phase, commercial sunflower oil was used.

The rheological and interfacial properties of the continuous phases were characterized using viscosity and interfacial tension as parameters. The interfacial tension with sunflower oil was determined using the Wilhelmy plate method (McClements, 1999) by means of a tensiometer K12 (Krüss GmbH, Germany). The evolution of interfacial tension under isothermal condition was followed during 10 min at 20°C. The rheological properties were measured using a stress-controlled rheometer (SR-5 from Rheometric Scientific, USA) equipped with a Peltier circulator system for temperature control. A parallel plate geometry of 40 mm diameter and a gap between 0.5 and 1 mm were used to measure flow curves. Viscosity (μ) always presented a shear-thinning behaviour that could be fitted by a power-law model:

$$\tau = k \dot{\gamma}^n = \mu \dot{\gamma} \quad (1)$$

where τ is the applied shear stress, $\dot{\gamma}$ is the shear rate (between 1 and 10³ s⁻¹), k is the consistency index and n the flow index.

2.2 Emulsion preparation and characterization

Emulsions were prepared using a continuous rotor-stator device (RS). This consisted of a jacketed steel column described in Figure 1. The stator was 35 mm in diameter, while the diameter of the rotor was 15 mm, and 30 mm when the pins were accounted for. The gap between the rotor and the stator was 2.5 mm, while the rotation speed (N) of the rotor could be controlled up to 1600 rpm. The rotor and stator were both fitted with seven rows of six pins with square ends (7.5×4×4 mm). The continuous phase prepared as described above and commercial sunflower oil were fed separately using two peristaltic pumps, so that the volumetric flow rate of each phase could be controlled independently. The flow rates were adjusted in order to obtain 15% v/v oil in the emulsion. The residence time (θ) can therefore be deduced by the following equation:

$$\theta = \frac{V_R}{F_C + F_D} = \frac{V_R}{1.15 \cdot F_C} \quad (2)$$

where V_R is the total volume of the rotor-stator device (140 mL), while F_C and F_D are the volumetric flows rates of the continuous and the dispersed phases, respectively. The temperature of the device was maintained constant at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, i.e. about room temperature, by water circulation in the jacket using a thermocryostat. Even though this temperature is not necessarily optimum for the adsorption of proteins at the oil/water interface, the influence of process temperature on emulsion preparation has not been studied in this work; the value of 24°C was retained because it corresponded to the slip melting point of sunflower oil and ensured that fat was totally melt, as is usual in emulsion preparation in the food industry.

For emulsions, viscosity was measured and analyzed using exactly the same methods as described in Section 2.1 for the continuous phase. On-line image analysis was used to measure the oil droplet size distribution at the exit of the RS device using a square quartz cell of 2 mm thickness. The images of the droplets were captured through the quartz cell using a CCD camera (Kappa Opto-electronics GmbH, Germany) mounted on a microscope Axiovert-25 (Carl Zeiss Jena GmbH, Germany). At least three images were taken for a given set of operating conditions. The captured images were analysed using the Image ProPlus™ image analysis software (MediaCybernetics, MD, USA). A semi-automatic procedure was developed to estimate the droplet size distribution. The surface-average or Sauter mean diameter (d_{32}) was used as the average diameter of the size distribution:

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^3}{\sum_{i=1}^n d_i^2} \quad (3)$$

The width of the droplet size distribution was quantified on the basis of its standard deviation s_0 .

The stability of emulsions was measured by following phase separation with respect to time. Emulsions were poured into a 25 mL glass tube, immediately after preparation; these were sealed to prevent evaporation. The samples were kept at room temperature; phase separation and creaming boundaries were monitored over time. The volume of oil separated due to creaming after 24 h was used for subsequent statistical analysis.

2.3 Experimental design and statistical analysis

Experimental design methodology constitutes a versatile strategy in production processes of the food industry. This is particularly relevant to problems that depend upon two distinct aspects, such as raw material properties and process variables (Sahni, Isaksson & Næs, 2001), which fits the objective of this work. This methodology provides various tools of gradually increasing complexity for comparing treatments and for screening and optimizing influential factors. In this work, the objective was to determine the feasibility of continuous emulsion preparation using BLPC and to examine the respective effects of recipe and process variables and their possible interactions with minimum aliasing, but also without optimization purpose; this excluded simultaneously fractional factorial and Plackett-Burman designs, but also *response surface methodology* (Montgomery, 2001).

Consequently, the influence of the formulation of the aqueous phase on its physicochemical properties, namely interfacial tension and viscosity, was studied using a conventional 2^2 factorial design with three replications of the centre point and randomization. In this paper, formulation factors are denoted X_1 and X_2 for protein content and xanthan content expressed as percentages (% w/v), respectively. Coded levels for X_1 and X_2 are reported in Table 1. The centre point (coded 0) corresponds to the arithmetic averages of the high (+1) and low (-1) levels for each factor, as is usual for continuous variables. Statistical procedures based on analysis of variance methods (ANOVA) were used to analyze the data, using the *Statistics Toolbox* from *Matlab 6.5 (The MathWorks, USA, 2002)*. Replication of the centre point was used to distinguish the pure experimental error from the lack-of-fit of the model. Factor significance was expressed in terms of p-values (p). As usual in statistical analysis, contrasts were assumed to be significant if $0.01 \leq p \leq 0.05$ (*), highly significant if $p \leq 0.01$ (**) and extremely significant if $p \leq 0.001$ (***). Conversely, model adequacy was assessed when $p \geq 0.05$ for the lack-of-fit test.

For emulsion preparation, process parameters, namely rotation speed (N) and residence time (θ), are coded X_3 and X_4 , respectively, and their levels are reported in Table 1. The combined influence of formulation and process variables on emulsion properties, such as d_{32} , rheological properties and emulsion stability, was studied using a split-plot experimental design, which means that a randomization restriction was applied between the formulation variables on one hand and the process parameters on the other hand (Ryan, 2007). Indeed, a 2^4 factorial design structure with r replications was not realistic, because a completely randomized design would have required $2^4 + r$ independent batch preparations of 2 L of the continuous aqueous phase. As the amount of meat proteins extracted from beef lungs is limited per extraction, the objective was to limit the variability of protein concentrates by reducing the number of preparations of the continuous phase. X_1 and X_2 could therefore be seen as “hard-to-change” factors (Kowalski et al., 2006; Ryan, 2007). As a result, the process variables were embedded in the formulation variables: this means that for a given set of formulation variables (X_1 , X_2), all the runs corresponding to the combinations of process parameters (X_3 , X_4) were carried out using the same batch of continuous aqueous phase. The consequence was that a non-replicated set of 2^4 runs required only four

preparations for the aqueous phase, similar to four blocks, as shown by Figure 2a. A similar example on the combined influence of process and preparation method of pulp was reported by Montgomery (2001). In this paper, X_1 and X_2 constitute the whole-plot design, while X_3 and X_4 belong to the sub-plot design; randomization was therefore restricted to process variables.

As the split-plot and 2^4 factorial structures only differ by the randomization restriction, the difference between both kinds of designs is often disregarded, but this can lead to erroneous conclusions (Kowalski & Potcner, 2003; Potcner & Kowalski, 2004; Ryan, 2007). Indeed, a split-plot structure is similar to a nested design with two levels of error (Montgomery, 2001), namely the whole-plot and the sub-plot error variances. The analysis of non-replicated split-plot designs is therefore tricky (Ryan, 2007) and is still the subject of current research and controversy. For example, Næs, Aastveit & Sahni (2007) summarized seven methods in the literature to analyse split-plot designs. The most common methods derive undoubtedly from a modified ANOVA, but regression analysis based on weighted least square estimators or on mixed modelling, such as REML or *restricted maximum likelihood* (Galwey, 2006), can also be found (Kowalski, Cornell & Vining, 2002). In this work, a strategy based on replication of the centre point has been followed. This is not frequent in the literature, but applications of the same principles can be found in Kowalski et al. (2002, 2006). The solution retained consists of three replications of the centre point of the whole-plot design ($X_1=X_2=0$), i.e. three additional batch preparations of the continuous phase ($r_{WP}=3$), in which the centre point of the sub-plot design ($X_3=X_4=0$) is replicated four times ($r_{SP}=4$) to maintain the symmetry of the design, as shown in Figure 2b. This allows the application of a modified ANOVA in which all the degrees of freedom keep integer values. The final design consists finally of $2^4 + r_{WP} \times r_{SP} = 28$ runs.

The analysis of the whole-plot design was carried out as for a conventional 2^2 design with three replications of the centre point, using as responses the averages of the responses of the four runs for the different X_3 and X_4 levels for each batch preparation. Pure error in the whole-plot design was estimated from the r_{WP} replications of the $X_1=X_2=0$ centre point; this estimation was used to calculate the p-values of hypothesis testing on the main effects of X_1 and X_2 and the p-value of the interaction term $X_1 \cdot X_2$. For the sub-plot design, only the main effects (X_3 and X_4), their second-order interaction ($X_3 \cdot X_4$) and the second-order interactions between one factor of the whole-plot design and another one of the sub-plot design were accounted for, while all higher degree interactions were neglected. In this case, the estimation of the pure error for the sub-plot design was deduced by studying the variability between the r_{SP} replications in each of the r_{WP} complementary sub-plots of Figure 2b. The sub-plot error was used to estimate the p-values of hypothesis testing on the predictors of the sub-plot model. The ANOVA tables with two different error structures were therefore reconstructed from experimental data. For practical calculations, the *Statistics Toolbox* from *Matlab 6.5* (The MathWorks, USA, 2002) was used, as above.

As a conclusion, the approach based on a split-plot design presents the advantages to account for hard-to-change recipe factors with a design apparently similar to a 2^4 factorial design. The drawbacks associated with this approach consist first of the more complex ANOVA described above, but they also result from the fact that the whole-plot error, estimated from r_{WP} replications, is typically larger than the error from the 2^4 completely randomized design and is also usually larger than the sub-plot error. This can lead to a loss of information on the whole-plot factors that are estimated less precisely than the sub-plot factors. In this work, this weakness is, however, counterbalanced by the typical high effect of recipe variables that remain significant, even though their respective effects are probably underestimated in comparison to the sub-plot factors.

3. Results and discussion

3.1. Properties of continuous phases with BLPC

The rheological and interfacial properties of the five formulations of BLPC-xanthan solutions used in the 2^2 factorial design are reported in Table 2; interfacial tension σ in this table corresponds to values measured after 2.5 min. It must be mentioned that these σ values were close to those measured after 10 min, as illustrated in Figure 3a. The ANOVA table deduced from these results is reported in Table 3a. For σ , this table shows that the interaction term $X_1 \cdot X_2$ can be disregarded and that the two influential predictors, X_1 and X_2 , predict correctly the evolution of the response ($R^2=0.79$ and $p=7.5\%$ for lack-of-fit test). ANOVA also confirms that proteins (X_1) exhibit the most influential effect on σ . σ decreased when BLPC content was increased. This result could however be expected, as the proteins from BLPC act as an emulsifier. Conversely, it seems that xanthan gum plays a role that opposes the influence of proteins. This effect is particularly marked at very short time on the σ vs. time curves (data not shown): xanthan delays the decrease of interfacial tension vs. time, probably because higher viscosity delays the diffusion of proteins toward the interface. Consequently, minimum interfacial tension was achieved when xanthan content was minimized and protein concentration was maximized.

Rheological measurement confirmed the highly shear-thinning behaviour of the BLPC-xanthan aqueous solutions with a flow index n between 0.24 and 0.37 (Table 2). Viscosity values at 10 s^{-1} , 100 s^{-1} and 600 s^{-1} extracted from Figure 3b, as well as k values were subjected to ANOVA analysis. All present the same trends and only the ANOVA table of k will be reported and discussed. Results show that the logarithm of these

responses is better described by a linear model than the responses themselves. The ANOVA table of $\text{Log}(k)$ is therefore reported in Table 3b. The agreement between the model reduced to the influential predictors, namely X_1 and X_2 , and experimental data is remarkable, as $R^2=0.976$ and p is clearly insignificant for the lack-of-fit test. Results show that $\text{Log}(k)$ and all $\text{Log}(\mu)$ values increase both linearly with X_1 and X_2 predictors, i.e. with total solids in the primary phase. The effect of xanthan is stronger than that of proteins, although the effect of proteins remains of a similar order of magnitude. Conversely, the ANOVA table for n in Table 3c shows that only xanthan acts on n . In this case, the linear model also explains satisfactorily the response ($R^2=0.92$ and $p=85\%$ for the lack-of-fit test for the reduced model). n decreases when X_2 increases because of the shear-thinning effect of xanthan addition, as expected.

All these results are in good agreement with those of Selmane et al. (2010). σ data at oil/water interface in the presence of xanthan gum corroborates the results already obtained by these authors on surface tension at air/water interface, interfacial tension at oil/water interface and surface hydrophobicity without xanthan addition. The low values of interfacial tension in Table 2 show that proteins from BLPC display a high affinity with lipids, which is also indirectly proved by the high lipid residue of BLPC (about 15% w/w) that cannot be separated from proteins by centrifugation in the extraction procedure and by the high amount of proteins lost when attempting to remove lipids from BLPC by solvent extraction (Selmane et al., 2010). For solution viscosity, the effect of X_1 can be attributed to the presence of protein fractions of high molecular weight; indeed, Selmane et al. (2010) had distinguished nine protein fractions by gel electrophoresis and seven fractions by size exclusion chromatography ranging from 10 kDa to about 500 kDa. Although the formation of a protein-xanthan complex cannot be excluded, this is unlikely to occur because proteins from BLPC were recovered by isoelectric precipitation at pH 4.0, which means that they were negatively charged at pH 7.0 and incompatible with the carboxylated rigid chains of xanthan macromolecules (Syrbe et al., 1998); the absence of synergistic effect on the evolution of σ and rheological parameters vs. xanthan and protein contents agrees with this assumption. Association between meat proteins and xanthan is therefore clearly unfavoured for BLPC in the range of protein and xanthan contents used in this work.

3.2. Analysis of emulsion preparation with BLPC

Experimental data resulting from the 28 runs for d_{32} , k , n and emulsion stability is summarized in Table 4. At first sight, it can be seen from this table that the mean diameter of the droplets varies from 60 to 300 μm due to the influence of the controlled factors. The emulsions are usually more viscous than the continuous phase, as expected, although this does not appear clearly from the k and n values in Table 4, as both vary simultaneously. The comparison between these values and those of Table 2 show, however, that the continuous phase and the emulsion exhibit a similar shear-thinning rheological behaviour. Finally, Table 4 also highlights that emulsion stability seems to be extremely dependent on the formulation.

Quantitative analysis of the experimental design is presented in Table 5. This table distinguishes the effects of the factors and the significance of the whole-plot and the split-plot, respectively. For each dependent variable, only the influential predictors have been reported, with the p -values of the ANOVA analysis based on the split-plot linear model. For d_{32} , results were improved using the log-transformation of the dependent variable. Table 5 demonstrates clearly that d_{32} depends essentially on the sub-plot variables, i.e. on process factors, and that rotor speed is the key parameter of droplet size reduction, as it represents 73% of the total variability of the response on the 28 runs: increasing rotation speed decreases d_{32} , as expected. However, two other main factors play a lesser role: residence time and BLPC content. As expected, increasing the residence time, i.e. decreasing the flow rates, acts in the same way because it increases respectively the intensity and the duration of the mechanical treatment applied to the dispersed phase, such as shear, elongation, turbulence, etc., that promote the breakup of oil droplets (McClements, 1999). Increasing protein content probably speeds up the kinetics of the stabilisation of the new liquid/liquid interfaces formed by droplet breakup. Conversely, it must be mentioned that xanthan does not play any significant role on d_{32} . Another key point is that the droplet size distributions for the various treatments were always close to lognormal for BLPC, as illustrated by Figure 4. The distributions presented also scale invariance because they exhibited a constant s_0/d_{32} value of about 0.37, as highlighted by Figure 5. This result is in line with data obtained on foams produced continuously using similar RS devices by Labbafi et al. (2007); these authors found that the standard deviation of the droplet size distribution s_0 varied as $0.26 \cdot d_{32}^{1.06}$, but a linear relation could also be established for foams, as $s_0=0.34 \cdot d_{32}$ ($R^2=0.99$), which agrees with this work (Figure 5). This important result confirms quantitatively the analogy that can be drawn between the formation of foams and emulsions under mechanical stirring in continuous RS devices.

The influence of the factors on the rheological properties of the emulsions can also be explained quantitatively using linear models from the analysis of $\text{Log}(k)$ and n as dependent variables. Contrary to d_{32} , the viscosity of the emulsions depended mainly of the formulation variables in Table 5. This is clearly demonstrated by the results for $\text{Log}(k)$: both BLPC and xanthan contents contributed to increase the consistency of the emulsion, as expected. Conversely, the significance of the effect of xanthan content (X_2), the only influential factor affecting n , was weak (p -value close to 5%) and $R^2=0.54$ (whereas R^2 is more than 80% for other

variables). This could not be corrected by transformations of the dependent variable, which means the variability of n is probably too complex to be described in detail by linear models in the present study. According to McClements (1999), the viscosity of an emulsion is directly related to the viscosity of the continuous phase and any alteration in the rheological properties of the continuous phase has an influence on the rheology of the whole emulsion. This is clearly confirmed in Figure 6 which highlights the correlation between the viscosities of the emulsion and those of their respective primary phases at a shear rate of 100 s^{-1} . In this figure, the correlation coefficient was about 89%; this is also in line with the ANOVA tables for $\text{Log}(k)$ and n which show quantitatively that only formulation variables played a key role.

Finally, the amount of oil separated after 24h could also be described by a linear model after log-transformation of the dependent variable. Contrary to emulsion viscosity that resulted only from the formulation, and from d_{32} that was governed by process conditions, emulsion stability combined the respective influences of process and formulation variables in Table 5. Formulation variables were, however, of primary importance; both BLPC and xanthan content contributed to a decrease in oil separation, i.e. to an increase in emulsion stability against creaming, and their interaction $X_1 \cdot X_2$ favoured also significantly this trend. For process factors, the increase in emulsion stability when rotation speed X_3 was increased can be attributed to the simultaneous decrease of d_{32} . Indeed, according to Stokes' law, emulsion stability increases when the viscosity of the continuous phase increases, which agrees with the effects of X_1 and X_2 , but also when droplet diameter decreases (McClements, 1999). This corresponds to the main effect of X_3 in Table 5. However, the influence of X_3 on stability is reduced by the fact that the variation of d_{32} remains limited in this work. This explains also why an increase of residence time in the RS unit, that has a similar but lesser effect than rotation speed in Table 5, does not seem significant on emulsion stability.

As a conclusion, the analysis of the experimental design confirms that emulsion properties depend at the same time on the recipe and on the operating conditions. Process conditions and especially rotation speed govern the reduction of the Sauter mean diameter d_{32} . On the other hand, formulations variables, such as protein and xanthan contents determine the texture of the emulsions. Finally, the stability of emulsions can be improved by acting at the same time on formulation variables, as well as by an increase of rotation speed. Experimental data corroborate therefore the measurements of Selmane et al. (2010) of emulsion activity, capacity and stability parameters based on batch bench-scale experiments: BLPC display good emulsifying properties even in a continuous emulsion preparation process and in the presence of xanthan. Although BLPC is a rather complex mixture that includes 15% lipids and many protein fractions, this stems probably from the structure of some proteins among the various protein fractions that present a high affinity with oil/water interface, contribute rapidly to the formation of small droplets and are able to form stable interfacial layers that stabilize droplets. This is in line with the presence in BLPC of proteins with large hydrophobic regions, which had been demonstrated by Selmane et al. (2010) using ANS surface hydrophobicity measurements. A further insight in the understanding of the phenomena could be obtained by the identification of which proteins adsorb at the oil/water interface, but due to the complexity of BLPC protein content, this could only be achieved by using 2D gel electrophoresis coupled with mass spectrometry, which is beyond the scope of this work. Additionally, the interactions between BLPC and xanthan remain weak: xanthan acts mainly as a viscosifier that stabilizes the emulsion, but does not affect droplet size, which corroborates the results of section 3.1 on continuous phases and simplifies the analysis of the specific effect of the primary phase on emulsion preparation. From a process point of view, it appears that emulsion preparation has been achieved in the whole experimental domain, although it is true that poor process conditions had been disregarded (such as very low rotation speed, etc.); however, as these conditions were retained without a preliminary optimization procedure, it can be concluded that emulsion preparation remains easy when BLPC is used as the emulsifier. Finally, the effect of process parameters appears to agree perfectly with expectations, which shows that, qualitatively, these do not depend too severely on the device used in this work.

3.3. Comparison between BLPC and NaCN

The performance of BLPC as an emulsifier and emulsion stabilizer was compared with sodium caseinates (NaCN), a well-known emulsifying agent, by using only one formulation and a reduced set of operating conditions, rather than the full design used for BLPC. First, the recipe ($X_1=1$; $X_2=-1$) was selected for comparison between BLPC and NaCN (i.e. 3% w/v proteins and 0.1% w/v xanthan) because this produced an emulsion from BLPC that was the most sensitive to process conditions. Indeed, the highest and the smallest d_{32} values were observed with this recipe in Table 4, depending on rotation speed and residence time. On the basis of data from Selmane et al. (2010) obtained using batch bench-scale methods without xanthan, BLPC is known to present a higher surface hydrophobicity and emulsion activity index rather than NaCN, but a similar emulsion stability index. Another key difference between NaCN and BLPC is that NaCN consists of a relatively simple mixture of proteins that have relatively close structures and properties, whereas BLPC includes various protein fractions of molecular weight from 10 to 500 kDa, with the fact that they are soluble at pH 9 and insoluble at pH 4 as only similarity.

First, the interfacial tension of the aqueous solutions containing 3% w/v BLPC and 3% w/v NaCN, respectively, are compared in Figure 3a. This figure highlights that the use of BLPC reduces the interfacial tension σ from more than 15 mN/m for NaCN to 8.4 mN/m after 2.5 min. As mentioned before, the low interfacial tension value for BLPC may be explained by the high surface hydrophobicity and the limited solubility in water at pH 7 (about 70%) of proteins from BLPC (Selmane et al., 2010). These results also agree quantitatively with those of Selmane et al. (2010), obtained without xanthan, which confirms that xanthan does not significantly affect σ values after 2.5 min. However, Figure 3a shows also that the kinetics of the decrease of interfacial tension toward the equilibrium value was slower for BLPC than for NaCN. As the formation of a xanthan-protein complex may be disregarded both for NaCN and BLPC (see section 3.1), this agrees first with the adsorption of proteins presenting a higher molecular weight than NaCN, although the identification of adsorbed materials remains beyond the scope of this work because of the complexity of BLPC composition. Indeed, sodium caseinates are highly soluble at pH 7 and have a molecular weight between ranges between 19 and 24 kDa (Cheftel, Cuq & Lorient, 1985); conversely, the molecular weight of the main protein fractions of BLPC ranges between 37 and 75 kDa, with fractions up to 500 kDa and a lower solubility that promotes protein aggregation. Another possible reason that may explain the slower diffusion to the interface of meat proteins than NaCN is the higher viscosity exhibited by the continuous phase containing BLPC (see section 3.1 for discussion and Figure 3b for data): indeed, when BLPC was replaced by NaCN, the apparent viscosity of the aqueous solution decreased, regardless of the shear rate applied, and the shear-thinning behaviour of the recipe was less pronounced. As a result, the shear-thinning behaviour of the primary phase containing NaCN before emulsion preparation in Figure 3b could be fitted using $n=0.53$ and $k=0.17 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{0.53}$, which differs significantly from the values reported in Table 2 for BLPC.

Emulsions based on BLPC and NaCN were prepared under similar conditions in the continuous RS device. “Extreme” conditions, i.e. $X_3=X_4=-1$ and $X_3=X_4=1$, were retained for comparison purpose. Experiments were carried out in triplicate. Experimental results are reported in Table 6. These show that process parameters also govern droplet size for NaCN, as for BLPC. The average droplet diameter appeared to be always smaller with NaCN than with BLPC. This probably stems from the lower viscosity of the NaCN continuous phase, as it is known that lower viscosity enhances the influence of turbulence on droplet breakup in the RS device (Walstra, 1983). However, Figure 4 shows also that this is partly due to a reduced tail in the size distribution when NaCN was used as the protein, which affects significantly the surface-average diameter d_{32} , but has a weaker effect on the size distribution based on droplet number. This trend is also illustrated by Figure 7 which shows that size distribution is less uniform for BLPC than for NaCN. As for BLPC, NaCN-based emulsions were always more viscous than the continuous phase, but they remained far less viscous than BLPC-based emulsions (Figure 8), which is in accordance with the above-mentioned relationship between primary phase viscosity and emulsion viscosity (Figure 5). The consequence is that the short-term emulsion stability fell when BLPC was replaced by NaCN (Figure 9), although the 24h stability was similar for both types of proteins in Table 6. Indeed, creaming kinetics is strongly linked to the viscosity of the continuous phase and in this case, the decrease of this viscosity is not counterbalanced by the decrease of droplet diameter when NaCN is used in the recipe.

Finally, as sodium caseinates are known to be good emulsifiers in the food industry, experimental data validate the high emulsifying properties of BLPC that can be used for emulsification purpose not only at bench scale in batch preparations (Selmane et al., 2010), but also in a continuous process. Although both BLPC and NaCN provided emulsions with a similar 24h stability, BLPC emulsions had the highest long-term stability after high pressure homogenization at 200 bars because they could be kept for several weeks, whereas NaCN emulsions creamed totally in just under one week. From a practical point of view, the main difference between BLPC and sodium caseinates results from the higher viscosity conferred by BLPC to the continuous phase. The consequence is that larger droplets are obtained with BLPC, but this is counterbalanced by a lower creaming rate. This must be accounted for because it means that optimum process conditions for emulsion preparation using BLPC and NaCN are not necessary the same. In this work, both emulsifying agents were compared under similar process conditions using a limited range for process variables because optimization was beyond the scope of the investigations. Consequently, for establishing an unbiased comparison of BLPC and NaCN and a correct analysis of the specific effect of process parameters, further work is still needed and will consist in finding process conditions that account for the influence of these proteins on the properties of the continuous phase and that also optimize the properties of the emulsions.

4. Conclusions

In this work, a four-factor split-plot design has been shown to be a versatile tool for the analysis of the combined influence of process and formulation variables on emulsion properties, especially when the amount of some ingredients is limited and/or when the preparation of the primary phase includes “hard-to-change” factors. The drawback is, however, the complexity of ANOVA that includes two levels of errors. Experimental data highlighted that droplet size was governed by process parameters, residence time and particularly rotation speed, emulsion texture resulted mainly from the recipe, while emulsion stability against creaming was driven both by

process and formulation variables. Finally, the high emulsifying properties of BLPC were confirmed in the presence of xanthan. BLPC is therefore a good candidate in order to form and stabilize meat emulsions under steady state conditions in the food industry. Although the temperature of emulsion preparation was arbitrarily fixed just at the slip melting point of the oil phase, these trends can be assumed to be qualitatively independent of process temperature and only slight quantitative changes on d_{32} and emulsion stability are expected as a function of process temperature.

Current perspectives consist therefore of the optimization of BLPC use in foods. First, optimum temperature conditions between the slip melting point of fat and the denaturation temperature of BLPC are still to be determined, e.g. to promote protein adsorption. Similarly, replacing commercial proteins by BLPC induces several consequences that must still be accounted in food processing: e.g., primary phases based on BLPC exhibit a higher viscosity with a more pronounced shear-thinning behaviour than recipes containing an identical content of NaCN. From a fundamental point of view, perspectives involve the scale invariance reported for droplet size distributions in this work which is close to that obtained previously on bubble size distribution in foams prepared using a similar RS device: the generalization of this result to other recipes for continuous rotor/stator devices can be expected in the future.

5. References

- Barbut, S., & Mittal, G. S. (1992). Use of carrageenans and xanthan gum in reduced fat breakfast sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 25(6), 509-513.
- Boles, J. A., Rathgeber, B. M., & Shand, P. J. (2000). Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. *Meat Science*, 55(2), 223-231.
- Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., & Lorient, D. (1985). Protéines alimentaires: biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques. Paris: Tec & Doc.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1982). Colloids in foods. London: Applied Science Publishers.
- Galwey, N. W. (2006). Introduction to mixed modelling. Beyond regression and analysis of variance. Chichester: John Wiley & Sons.
- Kooshan, N., Jianshe, C., & Mousavi, M. (2007). Interaction of WPI and xanthan in microstructure and rheological properties of protein gels and O/W emulsions. *International Journal of Food Engineering*, 3(4), 9.
- Kowalski, S. M., Cornell, J. A., & Vining, G. G. (2002). Split-plot designs and estimation methods for mixture experiments with process variables. *Technometrics*, 44(1), 72-79.
- Kowalski, S. M., & Potcner, K. J. (2003). How to recognize a split-plot experiment? *Quality Progress*, 36(11), 60-66.
- Kowalski, S. M., Vining, G. G., Montgomery, D. C., & Borror C. M. (2006). Modifying a central composite design to model the process mean and variance when there are hard-to-change factors. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 55(5), 615-630.
- Labbafi, M., Thakur, R.K., Vial, Ch., & Djelveh, G. (2007). Development of an on-line optical method for assessment of the bubble size and morphology in aerated food products. *Food Chemistry*, 102(2), 454-465.
- Liu, D. C. (2002). Better utilization of by-products from the meat industry. <http://www.agnet.org/library/eb/515/>.
- McClements, D. J. (1999). Food emulsions, principles, practice and techniques. Boca Raton: CRC Press.
- Montgomery, D. C. (2001). Design and analysis of experiments (5th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Næs, T., Aastveit, A. H., & Sahni, N. S. (2007). Analysis of split-plot designs; an overview and comparison of methods. *Quality and Reliability Engineering International*, 23(7), 801-820.
- Potcner, K. J., & Kowalski, S. M. (2004). How to analyze a split-plot experiment? *Quality Progress*, 37(12), 67-74.
- Ryan, T. P. (2007). Modern Experimental Design. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Sahni, N. S., Isaksson, T., & Næs, T. (2001). The use of experimental design methodology and multivariate analysis to determine critical control points in a process. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 56(2), 105-121.
- Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y., & Munro, P. (2003a). Interfacial composition, microstructure and stability of oil-in-water emulsion formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: 1. sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 39-548.
- Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y., & Munro, P. (2003b). Interfacial composition, microstructure and stability of oil- in- water emulsion formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: 2. Whey protein isolate (WPI). *Food Hydrocolloids*, 17(4), 49-561.
- Selmane, D., Vial, C., & Djelveh, G. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79(4), 640-647.
- Selmane, D., Vial, C., & Djelveh, G. (2010). Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Science*, 84(3), 315-322.

Syrbe, A., Bauer, W., & Klostermeyer, H. (1998), Polymer science concepts in dairy systems; An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8(3), 79-193.

Walstra, P. (1983). Formation of emulsion. In P. Becher. *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 1 (pp. 87-127). New York, NY: Marcel Dekker.

Nomenclature

ANOVA	analysis of variance
BLPC	beef lung protein concentrate
DF	degrees of freedom (-)
d_i	droplet diameter (m)
d_{32}	Sauter mean diameter (m)
F	variance ratio for Fisher F-test
F_C	volumetric flow rate of the continuous/primary phase (m^3/s)
F_D	volumetric flow rate of the dispersed phase (m^3/s)
k	consistency index ($Pa.s^n$)
MDCM	mechanically deboned chicken meat
n	flow index (-)
N	rotation speed (rpm)
NaCN	sodium caseinate
p	p-value (-)
r_{SP}	number of replications of the split-plot (-)
r_{WP}	number of replications of the whole-plot (-)
R^2	correlation coefficient (-)
REML	restricted maximum likelihood
RS	rotor/stator
s_0	standard deviation of size distribution (m)
X_i	coded variable of the experimental design (-)
V_R	rotor/stator volume (m^3)
<i>Greek letters</i>	
γ	shear rate (s^{-1})
θ	residence time (s)
μ	viscosity ($Pa.s$)
σ	interfacial tension (N/m)
τ	shear stress (Pa)

List of Tables

Table 1. Coding of factors and levels for the experimental designs.

Table 2. Composition and physical properties of primary phases.

Table 3. ANOVA of the responses for primary phase properties including degrees of freedom (DF) and Fisher ratio (F) for: (a) σ ; (b) $\text{Log}(k)$; (c) n ; stars (*) measure the significance of the effect; signs (-) and (+) show the effect of an increase of the factor on the response.

Table 4. Split-plot design and responses for the analysis of emulsion properties.

Table 5. ANOVA of the split-plot designs for emulsion properties including $\text{Log}(d_{32})$, $\text{Log}(k)$, n and $\text{Log}(mL)$ oil separation after 24h: only the p-values of the influential predictors are reported and the signs (-) and (+) show the effect of the factor on the response; p-values for the plots are based on a lack-fit-test.

Table 6. Comparison between the properties of BLPC and NaCN-based emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$.

List of figures

Figure 1. Schematic representation of the rotor/stator device.

Figure 2. (a) Non-replicated split-plot design with four factors, two in the whole-plot design and two in the sub-plot design; (b) design augmentation including the $r_{WP}=3$ replications of the centre point of the whole-plot design and the $r_{SP}=4$ replications of the sub-plot design.

Figure 3a. Dynamic evolution of interfacial tension for (\diamond) BLPC and (\square) NaCN aqueous solutions with xanthan ($X_1=1$; $X_2=-1$).

Figure 3b. Viscosity curves of BLPC and NaCN continuous phases as a function of shear rate. BLPC: \diamond ($X_1=0$; $X_2=0$), \blacksquare ($X_1=-1$; $X_2=-1$), \blacktriangle ($X_1=-1$; $X_2=1$), \times ($X_1=1$; $X_2=-1$), \circ ($X_1=1$; $X_2=1$) and NaCN: \square ($X_1=1$; $X_2=-1$).

Figure 4. Droplet size distribution of (\bullet) BLPC and (\blacksquare) NaCN-based emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$, and process variables $X_3=1$ and $X_4=1$.

Figure 5. Illustration of the linear correlation between the standard deviation s_0 of the droplet size distribution and the Sauter mean diameter d_{32} .

Figure 6. Illustration of the linear correlation between the viscosity (μ) of the emulsions and of their respective continuous phases for BLPC recipes.

Figure 7. Images of oil droplets in BLPC and NaCN-based emulsions ($X_1=1$; $X_2=-1$; $X_3=1$; $X_4=1$).

Figure 8. Viscosity curves of emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$: $*$ BLPC ($X_3=1$, $X_4=1$); Δ NaCN ($X_3=1$, $X_4=1$); \circ BLPC ($X_3=-1$, $X_4=-1$); \square NaCN ($X_3=-1$, $X_4=-1$).

Figure 9. Oil phase separation from emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$ as a function of time: \circ BLPC ($X_3=1$, $X_4=1$); \square NaCN ($X_3=1$, $X_4=1$); \times BLPC ($X_3=-1$, $X_4=-1$); Δ NaCN ($X_3=-1$, $X_4=-1$).

Table 1. Coding of factors and levels for the experimental designs.

Factor	Factor code	Coded level		
		-1	0	+1
protein content (% w/v)	X ₁	1	2	3
xanthan content (% w/v)	X ₂	0.1	0.2	0.3
N (rpm)	X ₃	800	1150	1500
θ (min)	X ₄	2.0	3.4	4.8

Table 2. Composition and physical properties of primary phases.

X₁	X₂	σ (mN/m)	n	k (Pa.sⁿ)
0	0	15.6	0.30	1.80
-1	-1	14.9	0.32	0.75
-1	1	16.9	0.28	1.65
1	-1	8.5	0.37	1.55
1	1	12.9	0.24	5.00

Table 3. ANOVA of the responses for primary phase properties including degrees of freedom (DF) and Fisher ratio (F) for: (a) σ; (b) Log(k); (c) n; stars (*) measure the significance of the effect; signs (–) and (+) show the effect of an increase of the factor on the response.

(a) Source	Sum of squares	DF	F	p
X ₁	27.51	1	63.18	0.016* (–)
X ₂	9.95	1	22.86	0.0411* (+)
X ₁ X ₂	1.53	1	3.10	0.202
Lack-of-fit	9.30	1	21.36	0.045 (0.075) ⁽¹⁾
Pure error	0.87	2		
Total	49.16	6		

⁽¹⁾ p-value is 0.045 when X₁·X₂ is accounted for, but becomes 0.075 when the interaction, statistically not significant (p>0.2), is excluded from the model.

(b) Source	Sum of squares	DF	F	p
X ₁	0.931	1	237.7	0.004** (+)
X ₂	1.394	1	355.8	0.003** (+)
X ₁ X ₂	0.041	1	10.4	0.084
Lack-of-fit	0.007	1	1.9	0.300
Pure error	0.008	2		
Total	2.382	6		

(c) Source	Sum of squares	DF	F	p
X ₁	0.000225	1	0.36	0.612
X ₂	0.013225	1	20.88	0.045* (–)
X ₁ X ₂	0.002025	1	3.20	0.216
Lack-of-fit	0.000030	1	0.05	0.848
Pure error	0.001267	2		
Total	0.016771	6		

Table 4. Split-plot design and responses for the analysis of emulsion properties.

Preparation	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	d ₃₂ (mm)	n	k (Pa.s ⁿ)	Oil separated after 24h (mL)
1	-1	-1	-1	-1	0.25	0.39	0.45	7.5
	-1	-1	-1	1	0.29	0.30	0.99	19
	-1	-1	1	-1	0.14	0.29	0.71	20
	-1	-1	1	1	0.10	0.33	0.94	11
2	-1	1	-1	-1	0.29	0.25	2.3	2.0
	-1	1	-1	1	0.28	0.28	1.82	5.0
	-1	1	1	-1	0.13	0.27	2.19	1.0
	-1	1	1	1	0.11	0.26	2.24	3.0
3	1	-1	-1	-1	0.30	0.43	1.19	3.6
	1	-1	-1	1	0.21	0.43	1.25	17
	1	-1	1	-1	0.11	0.44	1.07	4.0
	1	-1	1	1	0.06	0.45	1.15	5.0
4	1	1	-1	-1	0.27	0.29	4.54	0.5
	1	1	-1	1	0.16	0.26	4.24	0.3
	1	1	1	-1	0.08	0.26	5.10	0.2
	1	1	1	1	0.08	0.29	4.97	0.0
5	0	0	0	0	0.12	0.32	1.83	1.6
	0	0	0	0	0.13	0.33	1.50	1.5
	0	0	0	0	0.14	0.29	2.16	1.4
	0	0	0	0	0.16	0.30	1.91	1.5
6	0	0	0	0	0.10	0.33	1.39	2.1
	0	0	0	0	0.13	0.33	1.56	2.0
	0	0	0	0	0.13	0.33	1.51	1.9
	0	0	0	0	0.16	0.31	1.64	2.0
7	0	0	0	0	0.12	0.34	1.38	1.9
	0	0	0	0	0.13	0.35	1.26	1.7
	0	0	0	0	0.13	0.36	1.20	1.8
	0	0	0	0	0.15	0.36	1.31	1.8

Table 5. ANOVA of the split-plot designs for emulsion properties including Log(d₃₂), Log(k), n and Log(mL) oil separation after 24h: only the p-values of the influential predictors are reported and the signs (–) and (+) show the effect of the factor on the response; p-values for the plots are based on a lack-fit-test.

Log(d ₃₂) : R ² =84.2%			
Whole plot p>6%	X ₁	0.04 –	
Sub-plot p>30%	X ₃	<10 ⁻⁴ –	
	X ₄	0.015 –	
n : R ² =54.4%			
Whole plot*** p>60%	X ₂	0.046 –	
Sub-plot p>50%	not significant		

Log(k) : R ² =84.8%			
Whole plot p>30%	X ₁	0.009 +	
	X ₂	6.10 ⁻⁴ +	
Sub-plot p>20%	not significant		
Log(mL oil) : R ² =87.0%			
Whole plot* p>9%	X ₁	0.007 –	
	X ₂	0.003 –	
	X ₁ X ₂	0.03 –	
Sub-plot P<5%	X ₃	0.02 –	

Table 6. Comparison between the properties of BLPC and NaCN-based emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$.

Proteins	X_3	X_4	d_{32} (mm)	n	k (Pa.s ⁿ)	Oil separated after 24h (mL)
BLPC	-1	-1	0.30	0.43	1.19	3.6
	1	1	0.06	0.45	1.15	5.0
NaCN	-1	-1	0.09	0.49	0.36	3.5
	1	1	0.05	0.64	0.18	5.0

Figure 1. Schematic representation of the rotor/stator device.

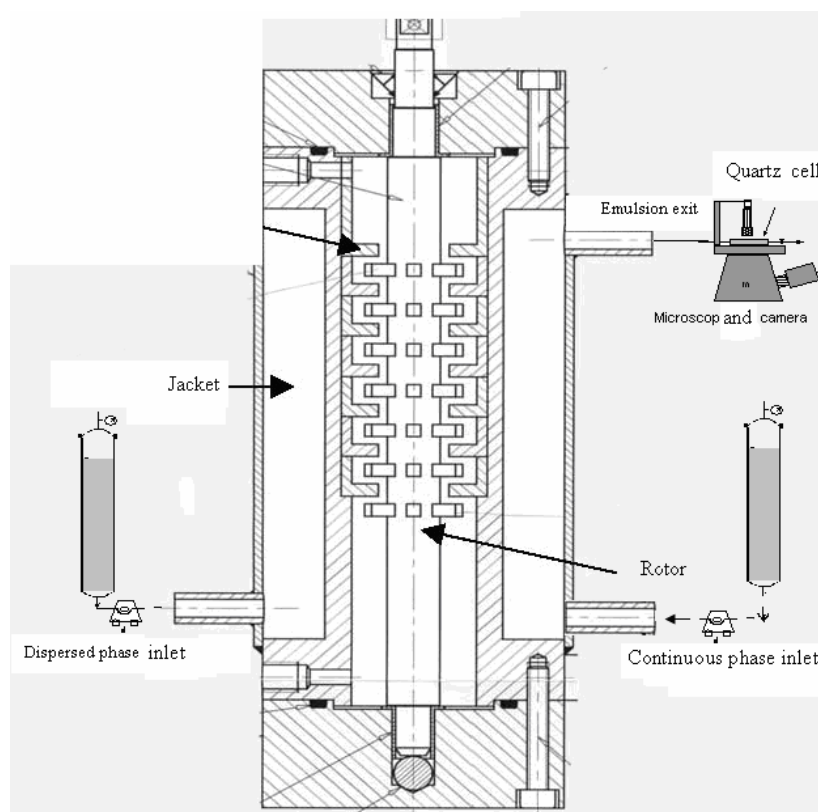
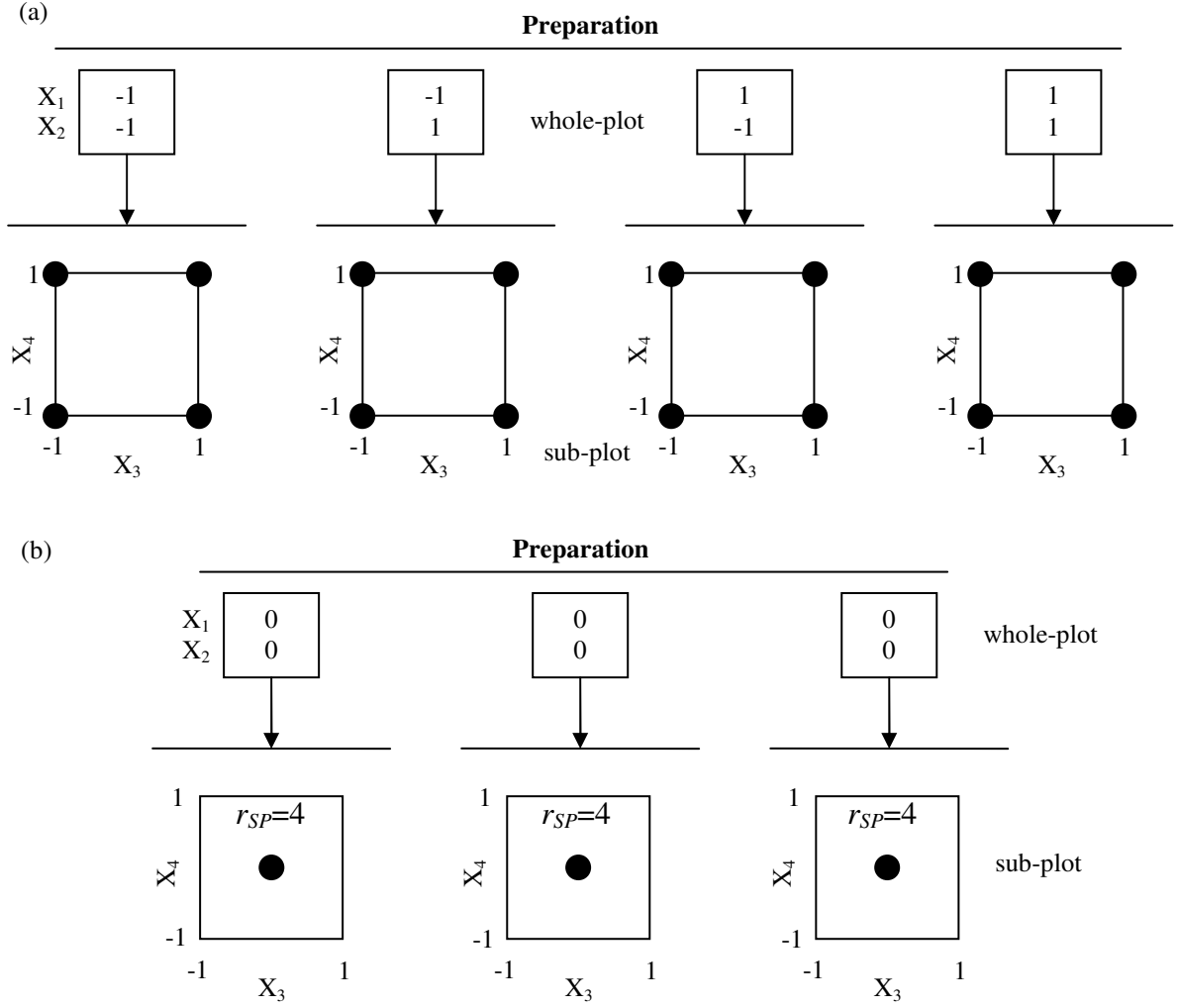


Figure 2. (a) Non-replicated split-plot design with four factors, two in the whole-plot design and two in the sub-plot design; (b) design augmentation including the $r_{WP}=3$ replications of the centre point of the whole-plot design and the $r_{SP}=4$ replications of the sub-plot design.



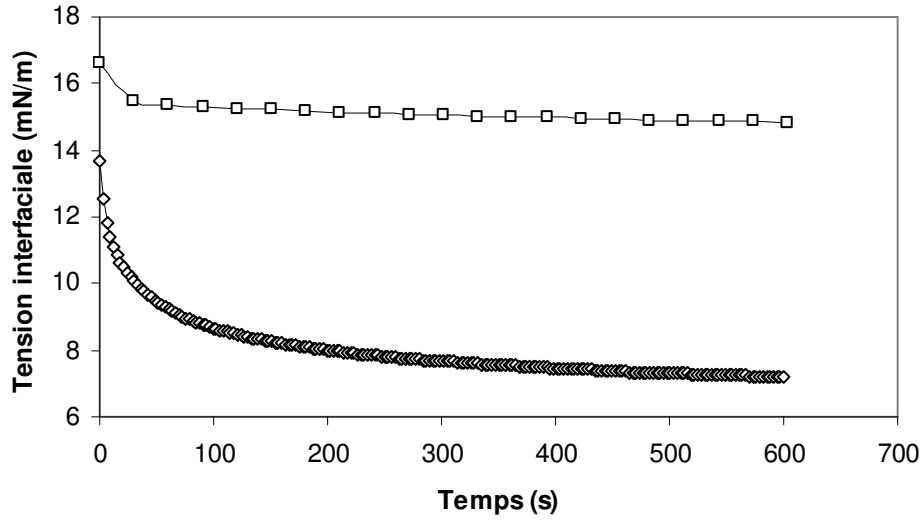


Figure 3a. Dynamic evolution of interfacial tension for (\diamond) BLPC and (\square) NaCN aqueous solutions with xanthan ($X_1=1$; $X_2=-1$).

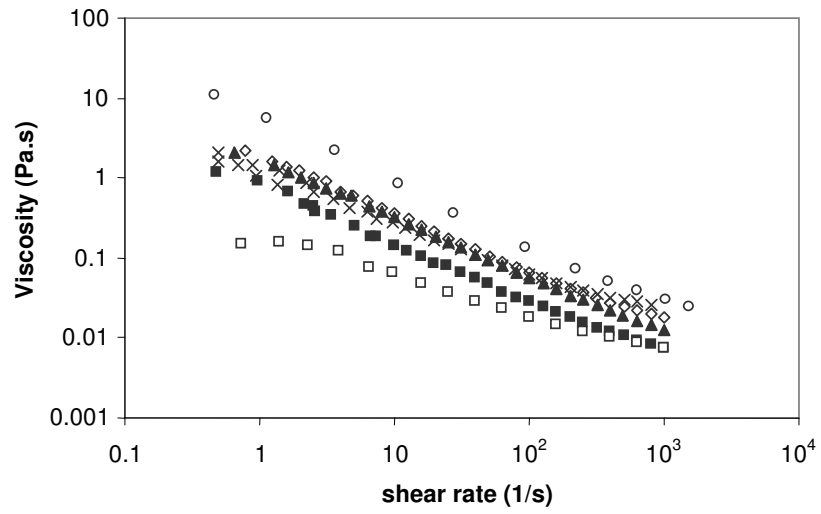


Figure 3b. Viscosity curves of BLPC and NaCN continuous phases as a function of shear rate. BLPC: \diamond ($X_1=0$; $X_2=0$), \blacksquare ($X_1=-1$; $X_2=-1$), \blacktriangle ($X_1=-1$; $X_2=1$), \times ($X_1=1$; $X_2=-1$), \circ ($X_1=1$; $X_2=1$) and NaCN: \square ($X_1=1$; $X_2=-1$).

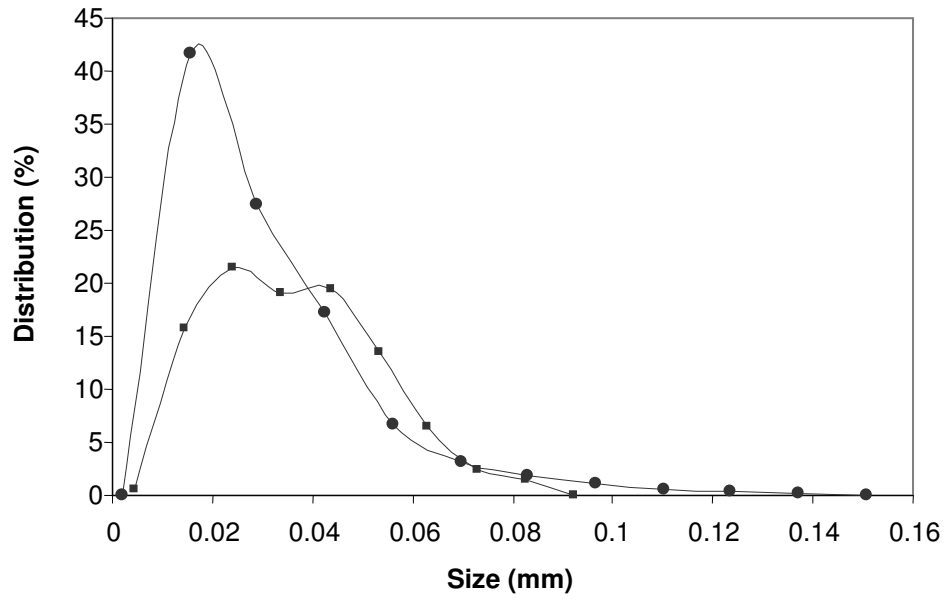


Figure 4. Droplet size distribution of (●) BLPC and (■) NaCN-based emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$, and process variables $X_3=1$ and $X_4=1$.

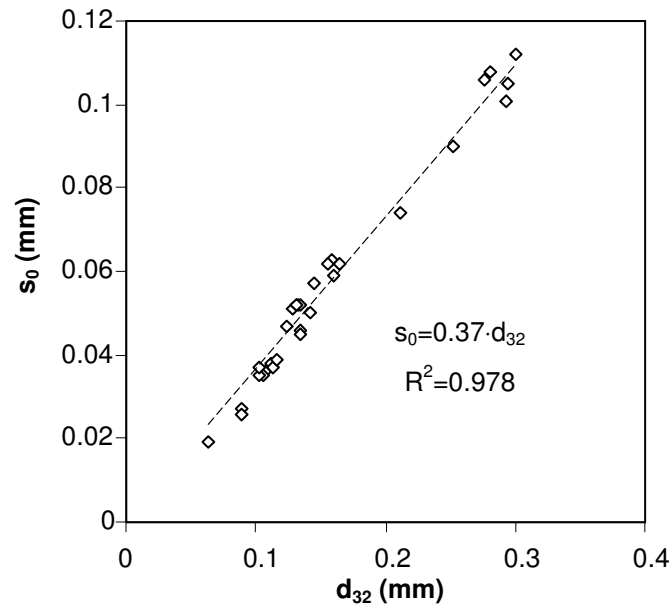


Figure 5. Illustration of the linear correlation between the standard deviation s_0 of the droplet size distribution and the Sauter mean diameter d_{32} .

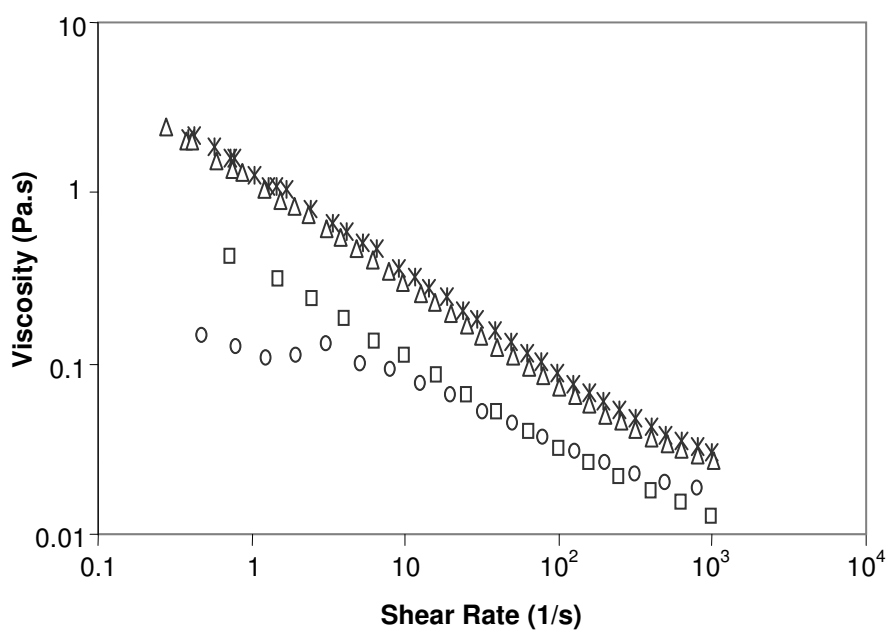


Figure 8. Viscosity curves of emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$: * BLPC ($X_3=1$, $X_4=1$); Δ NaCN ($X_3=1$, $X_4=1$); \circ BLPC ($X_3=-1$, $X_4=-1$); \square NaCN ($X_3=-1$, $X_4=-1$).

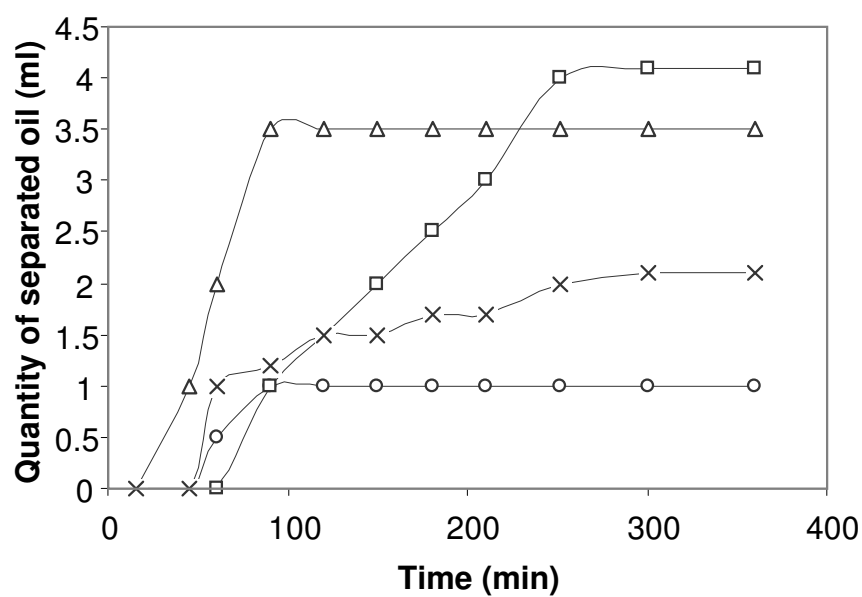


Figure 9. Oil phase separation from emulsions for $X_1=1$ and $X_2=-1$ as a function of time: \circ BLPC ($X_3=1$, $X_4=1$); \square NaCN ($X_3=1$, $X_4=1$); \times BLPC ($X_3=-1$, $X_4=-1$); Δ NaCN ($X_3=-1$, $X_4=-1$).

Résumé

L'objectif de ce travail est de montrer que certains coproduits d'abattage (VSM de poulet et de poumon de bœuf) peuvent constituer une source de protéines qui peut être valorisée sous forme d'ingrédients fonctionnels. Nos résultats ont montré la possibilité d'extraction de ces protéines par solubilisation en milieu alcalin, puis concentration soit par une technique membranaire (microfiltration), soit par précipitation en milieu acide. Il a été démontré que le meilleur rendement de récupération de protéines et la pureté la plus élevée ne correspondent pas nécessairement aux meilleures fonctionnalités. Les protéines de la VSM de poulet présentent un bon potentiel pour être utilisées dans les préparations à base de viande, notamment pour leurs fortes propriétés gélifiantes. Les protéines concentrées de poumon de bœuf (PCPB) ont montré une grande affinité avec les lipides qui traduisent leurs fortes hydrophobicité de surface et activité émulsifiante. Les PCPB ont également présenté une très bonne capacité émulsifiante en présence de xanthane lors de l'émulsification en continu par un système de rotor/stator. Il est donc possible de les utiliser comme agent émulsifiant en place des caséinates considérés comme l'agent émulsifiant référence. L'aptitude au foisonnement des PCBP dans des formulations complexes en batch et en continu n'est pas affectée par la présence des polysaccharides, mais elle est très sensible à la présence des lipides.

Mot-clefs : Coproduits d'abattage ; protéines ; extraction ; valorisation ; propriétés fonctionnelles.

Abstract

The aim of this work is to show that slaughterhouse by-products (MDM of chicken and beef lung) can be a good source of proteins that can be valorised as functional ingredients. Our results showed that it is possible to extract proteins from these by-products by alkaline solubilisation, followed by concentration of proteins using membrane process (microfiltration) or using acid precipitation. It was showed that the best extraction yield and the best purity of proteins extraction were not necessarily related to the best functional properties. Proteins extracted from MDM exhibited very good gelation properties and can replace commercial ingredients, such as plasma proteins in meat products. Beef lung concentrated proteins (BLCP) displayed a good emulsifying activity and a good surface hydrophobicity which is mainly due to their high affinity with lipids. The emulsifying properties of BLPC in the presence of xanthan gum were investigated under steady state conditions using a continuous rotor/stator device. The high emulsifying properties of BLPC were confirmed in the presence of xanthan. BLPC can therefore be used as emulsifiers in elaborated meat products in place of the commonly used caseinates. Finally, the foaming ability of BLCP in complex medium was investigated in batch and in continuous processes. The presence of polysaccharides in the formulations did not affect the overrun of the foams, whereas, the presence of lipids decreased remarkably the overrun.

Keywords: slaughterhouse by-products; proteins; extraction; valorisation; functional properties.